

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANE WINKLER MARQUES MACHADO

POLISSACARÍDEOS DE MICROALGAS: ESTUDO DA CAPACIDADE DE
MODULAÇÃO DE BACTÉRIAS COLONIZADORAS DO TRATO
GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

CURITIBA

2015

TATIANE WINKLER MARQUES MACHADO

POLISSACARÍDEOS DE MICROALGAS: ESTUDO DA CAPACIDADE DE
MODULAÇÃO DE BACTÉRIAS COLONIZADORAS DO TRATO
GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial para obtenção do Título de Doutora
em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Duarte
Nosedá

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Machado, Tatiane Winkler Marques

Polissacarídeos de microalgas: estudo da capacidade de modulação de
bactérias colonizadoras do trato gastrointestinal in vitro. / Tatiane Winkler
Marques Machado. – Curitiba, 2015.
207 f. : il.

Orientador: Miguel Daniel Nosedá.

Coorientadora: Maria Eugênia Duarte Nosedá.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências –
Bioquímica.

1. Prebiótico. 2. Microalga. 3. Glucanas. 4. Polissacarídeos. 5.
Microbiota. 6. Intestinos. I. Título. II. Nosedá, Miguel Daniel. III. Nosedá,
Maria Eugênia Duarte. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências –
Bioquímica.

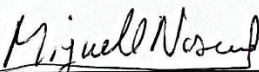
CDD (20. ed.) 589.4

TERMO DE APROVAÇÃO

TATIANE WINKLER MARQUES MACHADO

Polissacarídeos de microalgas: Estudo da capacidade de modulação de bactérias colonizadoras do trato gastrointestinal *in vitro*

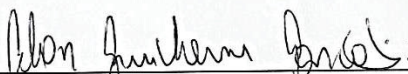
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



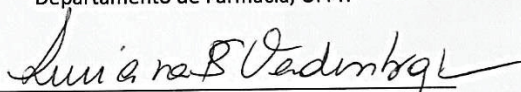
Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá – Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



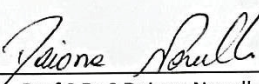
Prof.ª Dr.ª Juliana Bello Baron Maurer
Departamento de Bioquímica, UFPR



Alan Guilherme Gonçalves
Departamento de Farmácia, UFPR



Prof.ª Dr.ª Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR



Prof.ª Dr.ª Daiana Novello
Departamento de Nutrição, Unicentro

Curitiba, 12 de junho de 2015.

Dedico este trabalho a todos que com carinho me acompanharam nesta jornada e também para aqueles que farão uso deste material para consulta, que seja útil!

AGRADECIMENTOS

Agradecer não é tarefa fácil! Nesses quatro anos muitas foram as pessoas que passaram ou ficaram e deixaram algo de si comigo, penso que esse seja o momento oportuno de deixar registrado publicamente meu agradecimento!

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências-Bioquímica, pela oportunidade da realização desta importante etapa numa pós-graduação Conceito 6. Especialmente aos coordenadores profa. Glaucia Martinez (atual), Silvia Cadena e Prof. Miguel Daniel Nosedá (2009-2013) pela seriedade e pelo tempo de dedicado visando sempre o avanço e sucesso desse programa. Assim como a secretaria nas pessoas do Thiago e Irene Formigueri e pelos auxílios prestados.

Ao Programa REUNI, a CAPES e CNPQ, pelo suporte financeiro e ao PRONEX Carboidratos.

Ao prof. Miguel Nosedá e Maria Eugenia, muito obrigada pela orientação! Lá se vão seis anos desde que cheguei ao laboratório, sem saber nada de química carboidratos! Obrigada pelo voto de confiança, paciência, pelo estímulo, por compartilhar seus conhecimentos e desbravar comigo novos horizontes. Hoje vejo que o conhecimento é apenas a ponta do iceberg, mas se isso posso hoje conhecer, e tenho vontade de conhecer cada vez mais, é pela oportunidade que vocês me deram.

Às profas. Juliana Maurer e Regina Vilela por suas contribuições na correção do projeto e relatórios anuais. Bem como ao Prof. Alan Gonçalves, por ter aceitado ser banca interna deste trabalho.

Às professoras Luciana Vandenberghe e Daiana Novelo por terem aceitado o convite para compor a banca examinadora deste trabalho.

Aos professores e alunos que “tocam” o centro de RMN, muito obrigada pelas valiosas análises.

Às técnicas Eliz e Rosane, muito obrigada pelas análises cromatográficas e pelo carinho com que nos ajudam naquela hora da correria!

Minhas companheiras de 248: Ester, obrigada pelas orações, sei que em silêncio você pedia por mim sempre que me via em apuros, pela amizade, consideração e carinho. Fran, quando entrei no mestrado, achei todos um bando de “nerds” esquisitos e achei que não fosse fazer amigos, aí conheci você! Que me mostrou o contrário... Aquela amiga não importa a distância, o tempo, o assunto, se é pra rir ou pra chorar, obrigada pela força, pelas comilanças, pelos bate-papos...meu agradecimento se estende a todo o clã Colodi (Seu Pedro, Fátima, Marquinhos!) obrigada por me acolherem sempre e me fazerem sentir como se fosse da família! Jenifer, obrigada pela amizade na vida e parceria no trabalho! Nesses anos compartilhamos muitas alegrias e tristezas, e foi maravilhoso saber que temos uma a outra pro que der e vier! No lab, achei alguém pra compartilhar comigo das neuras de limpeza, organização, correr com orçamento e acho que fizemos uma boa dupla! Meu agradecimento por ser um exemplo de coragem, determinação, profissionalismo e acredite muitas vezes foi ver você assim e ter você como “equipe” (hahaha) que me impulsionou a continuar. Pelas horas de discussões sobre as bactérias, dosagens, sobre unhas e maquiagens! Ao aluno de iniciação científica Mateus, pelas gargalhadas que me proporcionou, te ensinar um pouco do que aprendi foi leve, por causa desse seu senso de humor, obrigada pela paciência! Tati Milani, querida, obrigada pela amizade que conquistamos você é muito especial! Rafael de Almeida (o bendito fruto entre as mulheres, rs) obrigada pela ajuda na análise do TGA e por me ensinar a usar o Origin, me salvou! Outras pessoas importantes: Amanda, Bárbara, Estela, Luciano Campestrini, Louise Provin, Juliana

Teodoro, e todos os IC's, bem como aos colegas do E3: Luciana, Cassiano, Mariana, Pauline, obrigada pela convivência sempre agradável.

Aos amigos do corredor dos carboidratos: Especialmente a Fer Simas que me mostrou denovo "o caminho", pelo carinho, pelos conselhos, pela amizade que tanto considero você é muito especial! Elaine Kiatkoski, pela amizade desde o mestrado, as comilanças, o carinho, por ser minha personal stylist, estar sempre comigo torcendo por mim, outra muito especial! Georgia, você é de longa data, como eu costumo dizer é meu orgulho, obrigada por fazer parte da minha vida com sua amizade! Shayla, Thaisa, Andreia Ruthes, Fher Smiderle, Alex, Larry, Yony, obrigada pelas viagens, momentos de descontração, cachoeira, Vila Velha, pelas risadas, pelos almoços compartilhados, por essa vida que viveram comigo esses anos!

Sarah Sacks e Vania Pankievicz obrigada pelo ano na representação discente, muitos pepinos de alunos pra resolver e um curso de inverno pra organizar, mas sinceramente, nos superamos e fomos um sucesso!

Aline Madalozzo e Sarah Sacks (denovo) integrantes da panelinha do mestrado, no doutorado fomos menos almoçar ao "massinha" e fofocar (que pena!), mas sei que nossa amizade é de coração, muito obrigada por estarem sempre comigo!

As amigas da faculdade: Leticia, Bruna, Beth, Glau, Alana, Karin, Georgia (denovo!) obrigada por não desistirem de mim, sei que por vezes fui uma chata, faltei aos encontros e sempre estão lá vocês orgulhosas das minhas conquistas, manter amizade mesmo depois de anos da formatura é uma dádiva, obrigada pela amizade!

Aos meus amigos Alex, Dayana, Tissa, Flavio, Raquel (amiga de infância) muito, muito obrigada pelas festas, jantas, churrascos, japonês, pelos xotes, risadas, cantoria de fim de noite e pelos momentos maravilhosos! Para a Veronica Munaro,

agradecimento especial por ter compartilhado a vida comigo, mesmo não tão próximas nesse período sei que estamos sempre juntas!

Aos meus amigos do cursilho e grupo de jovens, juntos muitas vezes rezamos pra que eu finalizasse essa etapa, com vocês me fortaleci na fé e passei por momentos inesquecíveis, obrigada pela compreensão nas faltas, pela amizade, pelas festas, pela torcida, Nathalie, Thaianne, Michele, Priscila, Kaká, Milena, Allan, Mariana, Viviani, Margarete, Dna. Nadir, e tantos outros inumeráveis.

Aos meus amigos que fiz na dança de salão: Especialmente a Tania, foi parceira de dança, de café ou de não fazer nada! Obrigada pelos domingos e feriados que deu uma passadinha comigo no lab pra ver se estava tudo bem com as “minhas” bactérias, pelas horas de fofoca antes de ir dormir, por ir dormir lá em casa pra eu não ficar sozinha, por ouvir minhas lamúrias, por me aconselhar, por me chacoalhar quando precisava, estendo meu agradecimento a sua mãe (e minha quase mãe) Beth por todo o carinho, amizade e cafés que tomei lá, as duas pela enorme quantidade de pessoas queridas que me apresentaram (Manoel, Netto, Monica, os padres, Sandra, a madrinha, etc...)! Klaus (ou Par), obrigada por me aguentar sempre, mesmo quando eu ia “azedada” porque tudo dava errado no lab, era um samba com você pro azedume passar! Rodrigo Costa, obrigada por encher minha vida com seu sorriso, sua alegria, seu incentivo, sua amizade, por “encher minha bola” tentando me convencer de como sou linda (rsrs). A profa. Sheila Santos por me dizer coisas dançantes que eu levo pra vida, e pelos que eu sei que torcem por mim nessa etapa profa. Ana Maria C. Filadelfi, Rafa Toledo, Lucas, Luiz, John, Amanda e tantos outros, sintam-se todos agradecidos, dançar tornou estes últimos anos muito mais leves.

A minha amada mãe: não bastaria um “muito obrigada”! Agradeço o exemplo de ser humano que é você, humilde, honesta, batalhadora, linda! Obrigada pela maracujina antes da qualificação, pelas velas, pelas orações, pela noite em claro na noite da crise de gastrite, e tantas outras, e por ter me trazido pelas mãos até aqui. Pode não

parecer, mas sem você nos bastidores eu não teria chegado, sei que com você ainda irei muito longe!

A minha irmã Margarete, a primeira pessoa que me disse, “porque você não faz mestrado?” que plantou essa sementinha, obrigada pelo companheirismo e pelo amor com que cuida de mim! Pelos almoços quando a mãe não estava aqui, por me fazer mandar mensagem todas as noites quando chegasse, por estar comigo! Eu, você a mãe e a Julia, fazemos o quarteto fantástico, amo como somos unidas e parceiras, amo vocês!

As minhas pequenas Julia, Manuela e Annabella, ser tia é uma dádiva de Deus. Obrigada por fazerem parte da minha vida, por me fazerem brincar e rir como criança, pelo carinho, cuidado e preocupação que vocês têm com a Tia Tati e pelo amor que temos umas pelas outras.

Ao meu irmão Valmir, você é um exemplo de força, empenho, coragem, trabalho, dedicação. Obrigada pelos papos e conselhos, pelo incentivo, pelo carinho, pelas piadas (E ai tá acabando esse doutorado, agora vai começar a trabalhar?). A distância de você e das meninas, é dura, mas não afasta os corações.

Ao meu pai, que mesmo de longe se orgulha de minhas vitórias. Ao irmão mais pequenino Reinel, a irmãzona te ama! Aos cunhadinhos, Edgard não só por proporcionar os almoços em família no domingo (uma doutoranda precisa se alimentar bem!), mas pela aquela tarde de domingo de sono perdido me ajudando analisar estatisticamente os dados dos prebióticos. Joyce, obrigada pelas conversas e pelo incentivo!

Agradeço a Deus, nesses últimos anos estreitei minha relação com Ele. Como foi bom saber que eu tinha um Pai, amigo, e protetor, poder confiar e entregar nas mãos de Deus todo o meu caminho. Obrigada Deus por ter colocado todas essas

peessoas especiais ao meu redor, por ter secado minhas lágrimas na angústia de terminar, por ter consolado as frustrações, pela força de trabalho, por ter me feito mais alegre do que triste. Obrigada Jesus por me amar e me cuidar sempre, tendo me permitido chegar até aqui.

A todos que fizeram parte desse trabalho direta ou indiretamente. A todos os amigos e colegas do departamento. A todos os professores que compartilharam seus conhecimentos.

Muito Obrigada!!!

“Nada te perturbe, nada te amedronte,
tudo passa, a paciência tudo alcança. A
quem tem Deus nada falta só Deus
basta!”

Santa Tereza D’ávila

RESUMO

Microalgas são seres unicelulares e encontram-se amplamente distribuídos na natureza. Esses organismos são considerados boas fontes de compostos bioativos devido a sua composição química diversa e serem cultiváveis em larga escala. As espécies utilizadas neste trabalho foram as microalgas marinhas *Pavlova gyrams* (PG) e *Pavlova lutheri* (PL), pertencentes à divisão Haptophyta. Diferentes estruturas de carboidratos tem sido capazes de se ligar a bactérias enteropatogênicas, impedindo assim a adesão dos patógenos ao trato gastrointestinal (TGI) dos hospedeiros (etapa fundamental na instalação de infecção em animais e humanos). Além disso, os carboidratos também aumentam seletivamente a concentração de bactérias benéficas ao hospedeiro no TGI, atividade conhecida como prebiótica. Este trabalho teve como objetivo extrair e caracterizar a estrutura química dos polissacarídeos de *Pavlova lutheri* e *P. gyrams*, e avaliar o potencial prebiótico *in vitro* (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356) destes polissacarídeos, bem como sua capacidade de adesão à bactérias patogênicas (*Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028), obtendo assim um panorama geral da atividade destes polissacarídeos sobre a microbiota intestinal. Para isso, ambas as microalgas foram cultivadas em meio Guillard f/2, durante 14 dias, na sequência foram submetidas a centrifugação e liofilização para obtenção da biomassa seca. A biomassa seca de PG e PL foi submetida a extração sequencial (20 g/L) em água a 80 °C, por 2 h sob agitação magnética, centrifugada onde o resíduo foi submetido a extração alcalina (20 g/L) com NaOH 0,5 M a 80 °C, por 2 h sob agitação magnética e centrifugado, o sobrenadante foi neutralizado com HCl 0,1 M e dialisado. Ambos os sobrenadantes aquoso (AQ) e alcalino (AL) foram precipitados com 3 V de etanol, centrifugados e o pellet resuspendido em água e submetido a tratamento de gelo-degelo, centrifugadas, dialisadas e liofilizadas, rendendo frações precipitadas em gelo-degelo (AQ-P e AL-P) e solúveis em gelo-degelo (AQ-S e AL-S), assim como frações correspondentes ao sobrenadante etanólico (AQ-SE e AL-SE). Análises químicas e espectroscópicas mostraram que as frações AQ-P de ambas as microalgas são compostas por glucanas lineares β -(1 \rightarrow 3)-ligadas, enquanto as frações AQ-S e AQ-SE por glucanas ramificadas β -(1 \rightarrow 3,6)-ligadas. As frações alcalinas AL-P, AL-S e AL-SE, são majoritariamente compostas por proteínas e apresentam composição monossacarídica heterogênea. Essas frações foram submetidas ao teste de ligação a *S. typhimurium in vitro* que indicou que a maior parte das frações testadas apresenta capacidade de ligação estatisticamente igual ao controle positivo BioMos® (Alltech), principalmente as alcalinas e as β -glucanas lineares. Também foi desenvolvido e aplicado teste para verificação do potencial prebiótico dessas frações, na avaliação do crescimento de *L. acidophilus*, o qual mostrou que a maior parte das frações foi estatisticamente igual ao controle positivo inulina, sendo que as frações compostas por β -glucanas ramificadas promoveram maior variação no crescimento das culturas. Conclui-se que as microalgas utilizadas neste trabalho são boas fontes de moléculas que se mostraram ativas na modulação de bactérias que colonizam o TGI, apresentando potencial para estudos *in vivo* e formulação de produtos de interesse, a princípio, para consumo animal.

Palavras-chave: Microalgas. β -glucanas. Prebióticos. Capacidade de ligação. Enteropatógenos.

ABSTRACT

Microalgae are unicellular and widely distributed in nature. These organisms are considered good sources of bioactive compounds due to their diverse chemical composition and they are suitable to be cultivated on a large scale. The species used in this study were the marine microalgae *Pavlova gyrams* (PG) and *Pavlova lutheri* (PL), belonging to Haptophyta division. Different carbohydrate structures have been able to bind to enteropathogenic bacteria preventing the adhesion of pathogens to the epithelial host (fundamental stage in the onset of infection in animals and humans), and selectively increase the concentration of beneficial bacteria in the host gut, referred to as prebiotic activity. This study aimed to cultivate microalgae to obtain biomass, extract and characterize the polysaccharides in order to test it regarding their binding capacity to bacteria *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028 and their prebiotic activity with *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. For this, the microalgae were grown in Guillard f/2 for 14 days, centrifuged and subjected to freeze-drying to obtain dry biomass. The dried biomass PG and PL was then subjected to sequential extraction (20 g/L) in water at 80 °C for 2 h under magnetic stirring, the residue was subjected to alkaline extraction (20g/L) NaOH 0,5 M at 80 °C for 2 h under magnetic stirring and centrifuged, the supernatant was neutralized with 0,1 M HCl and dialyzed. Both aqueous (AQ) and alkali (AL) supernatants were precipitated with EtOH 3 V, centrifuged and the pellet resuspended in water and subjected to freeze-thawing treatment, centrifuged, dialyzed and lyophilized, yielding precipitated fractions from freeze-thawing (AQ P and AL-P), soluble fractions (AQ-S and AL-S) and fractions corresponding to the ethanolic supernatant (AQ-SE and AL-SE). Chemical and spectroscopic analysis showed that both microalgae fractions AQ-P are composed of linear glucans β - (1 \rightarrow 3) -linked while AQ- S and AQ-SE fractions of branched glucan β - (1 \rightarrow 3,6) -linked. Alkaline fractions AL-P, AL-S and AL-SE, are mainly composed of proteins and present heterogeneous monosaccharide composition. These fractions were subjected to the test of binding capacity to *S. typhimurium* which indicated that most of the fractions tested shows binding capacity statistically equal to BioMos® positive control (Alltech), especially the alkaline and linear β -glucans. It has also been developed and implemented test to determine the prebiotic potential of these fractions, to evaluate the growth of *L. acidophilus*, which showed that most of the fractions was statistically similar to the positive control inulin, and the fractions consisting of branched β -glucans promoted higher variation in growth. It was concluded that the microalgae used in this work are good sources of molecules that were active in the modulation of bacteria colonizing the gut, with potential for *in vivo* studies and formulation of products of interest, at first, in animal industry.

Keywords: Microalgae. β -glucans. Prebiotics. Binding capacity. Enteropathogens.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE AÇÃO.....	33
FIGURA 2	- DIVISÃO TAXONÔMICA A QUE PERTENCE O MATERIAL DE ESTUDO	36
FIGURA 3	- FOTO DE <i>Pavlova lutheri</i>	37
FIGURA 4	- MODELO ESQUEMÁTICO DE FLOCULAÇÃO	44
FIGURA 5	- MODELO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA EM HÉLICE DE D-GLUCANAS β -(1→3)-LIGADAS	50
FIGURA 6	- FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL	60
FIGURA 7	- CURVAS DE CRESCIMENTO DE <i>Pavlova gyrams</i> EM MEIO ERDSCHREIBER E GUILLARD F/2	65
FIGURA 8	- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Pavlova lutheri</i> E <i>P. gyrams</i> EM MEIO GUILLARD F/2.....	66
FIGURA 9	- TEOR DE MACRONUTRIENTES NA BIOMASSA DE <i>P. lutheri</i> (A) E <i>P. gyrams</i> (B) DURANTE O CULTIVO.....	67
FIGURA 10	- PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES PGAQ-P (A) E PGAQ-S (B).73	
FIGURA 11	- ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PGAQ-P	75
FIGURA 12	- ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PGAQ-P.....	76
FIGURA 13	- ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PGAQ-P	77
FIGURA 14	- ESTRUTURA PROPOSTA PARA O POLISSACARÍDEO DA FRAÇÃO PGAQ-P	77
FIGURA 15	- ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PGAQ-P (A) E PGAQ-S (B)	78
FIGURA 16	- ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PGAQ-S (A) E DEPT 135 (B)	79
FIGURA 17	- ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PGAQ-S.....	80
FIGURA 18	- ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PGAQ-S	81
FIGURA 19	- ESTRUTURA PROPOSTA PARA O POLISSACARÍDEO DA FRAÇÃO PGAQ-S	82
FIGURA 20	- ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PGAQ-S (A) E PGAQ-SE (B)	85

FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PGAQ-SE (A) E DEPT 135 (B)	86
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PGAQ-SE	87
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES PGAL-P (A), PGAL-S (B) E PGAL-SE (C)	88
FIGURA 24 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES PLAQ-P (A) E PLAQ-S (B) ..	91
FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PLAQ-P	93
FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PLAQ-P	93
FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PLAQ-P	94
FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PLAQ-P (A) E PLAQ-S (B).....	95
FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PLAQ-S (A) E DEPT 135 (B)	96
FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PLAQ-S	97
FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PLAQ-S	98
FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PLAQ-S (A) E PLAQ-SE (B)	100
FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PLAQ-SE.....	101
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PLAL-P (A), PLAL-S (B) E PLAL-SE (C)	102
FIGURA 35 - PERDA DE MASSA E TAXA DE PERDA DE MASSA DOS EXTRATOS OBTIDOS DE <i>P. LUTHERI</i> : PLAQ-P (A) PLAQ-S (B) PLAQ-SE (C) PLAL-P (D) PLAL-S (E) PLAL-SE (F).....	103
FIGURA 36 - PERDA DE MASSA E TAXA DE PERDA DE MASSA DOS EXTRATOS OBTIDOS DE <i>P. GYRANS</i> : PGAQ-P (A) PGAQ-S (B) PGAL-P (C) PGAL-S (D).....	108
FIGURA 37 - PERDA DE MASSA E TAXA DE PERDA DE MASSA DA BIOMASSA DAS MICROALGAS <i>P. GYRANS</i> (PG) (A) E <i>P. LUTHERI</i> (PL) (B) ..	111
FIGURA 38 - MECANISMOS ANTI-ADESÃO	132
FIGURA 39 - ADHESION CURVES OF <i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium ATCC 14028 IN MICROTITRATION PLATES COATED WITH (A) <i>Pavlova gyrans</i> EXTRACTS AND (B) <i>P. lutheri</i> EXTRACTS.....	143

FIGURA 40 - LINEAR REGRESSION FOR <i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium ATCC 14028	144
FIGURA 41 - HSQC SPECTRUM OF LINEAR β -GLUCAN (1 \rightarrow 3)-LINKED IN THE GW-P FRACTION OBTAINED FROM <i>Pavlova gyrams</i>	146
FIGURA 42 - ESTRUTURA QUÍMICA DA INULINA.....	174
FIGURA 43 - CURVA PADRÃO DE <i>L. acidophilus</i> OD INICIAL 0,1 (A) E OD INICIAL 0,5 (B).....	183
FIGURA 44 - CURVA PADRÃO DE <i>L. acidophilus</i> OD INICIAL 1 EM MICROPLACAS MANTIDAS EM ANAEROBIOSE (A) E EM EPENDORFES (B).....	184
FIGURA 45 - CURVA PADRÃO DE <i>L. acidophilus</i> OD INICIAL 1.....	185
FIGURA 46 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>L. acidophilus</i> NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INULINA E CONTROLES DE CRESCIMENTO	186
FIGURA 47 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO PADRÃO DE INULINA SEM NENHUM TRATAMENTO (A) E ESTERILIZADO (121°C POR 15 min) (B)	187
FIGURA 48 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PGAQ-S SEM NENHUM TRATAMENTO (A) E ESTERILIZADA (121°C POR 15 MIN) (B)	188
FIGURA 49 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PGAL-P SEM TRATAMENTO (A) E ESTERILIZADA (121 °C POR 15 MIN) (B) ...	189
FIGURA 50 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>L. acidophilus</i> NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INULINA AUTOCLAVADA E CONTROLES DE CRESCIMENTO	190
FIGURA 51 - CURVAS DE CRESCIMENTO DE <i>L. acidophilus</i> EM MEIO BASAL SUPLEMENTADO COM INULINA OU AS FRAÇÕES PGAQ-S, PGAL-SE, PLAL-S	192

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE <i>Pavlova lutheri</i> (PL) E <i>P. gyrans</i> (PG).....	69
TABELA 2	- RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE <i>P. gyrans</i> (PG) E <i>P. lutheri</i> (PL), COMPARANDO-SE OS DIFERENTES PROCESSOS DE SEPARAÇÃO, CENTRIFUGAÇÃO (C) E FLOCULAÇÃO (F)	70
TABELA 3	- ANÁLISE QUÍMICA E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (mol %) DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA <i>Pavlova gyrans</i>	71
TABELA 4	- ANÁLISE QUÍMICA E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES TRATADAS COM DMSO DA MICROALGA <i>Pavlova gyrans</i>	72
TABELA 5	- ASSINALAMENTOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES PGAQ-P E PGAQ-S DE <i>Pavlova gyrans</i>	82
TABELA 6	- INTEGRAÇÃO DE SINAIS DA REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES PGAQ-P E PGAQ-S	83
TABELA 7	- ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES AQUOSAS DE <i>P. gyrans</i>	89
TABELA 8	- ANÁLISE QUÍMICA E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (mol %) DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA <i>Pavlova lutheri</i>	90
TABELA 9	- INTEGRAÇÃO DE SINAIS DA REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES PLAQ-P E PLAQ-S.....	99
TABELA 10	- RESUMO DA PERDA DE MASSA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA <i>P. lutheri</i> E <i>P. gyrans</i>	107
TABLE 11	- GROWTH PARAMETERS OF <i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium ATCC 14028 IN MICROTITRATION PLATES COATED WITH MICROALGAE EXTRACTS	141
TABLE 12	- YIELDS, CHEMICAL ANALYSES AND MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF SAMPLES OBTAINED FROM <i>P. gyrans</i> AND <i>P. lutheri</i> WITH THE HIGHER BINDING CAPACITY	145

TABELA 13 - VARIAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA DE <i>L. acidophilus</i> EM DIFERENTES EXTRATOS DE MICROALGAS	191
TABELA 14 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES COM MAIOR POTENCIAL PREBIÓTICO	196
TABELA 15 - VARIAÇÃO NO PH DAS CULTURAS DURANTE 48 H DE FERMENTAÇÃO IN VITRO DE DIFERENTES EXTRATOS DE MICROALGAS POR <i>L. acidophilus</i>	197

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - NOMES USUAIS DE β -GLUCANAS LINEARES E RAMIFICADAS OBTIDAS DE DIFERENTES FONTES	48
QUADRO 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA SEMI-DEFINIDO GUILLARD F/2	54
QUADRO 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA INDEFINIDO ERDSCHREIBER.....	54
QUADRO 4 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA	179

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α	– alfa (denota anomeridade no caso de polissacarídeos)
β	– beta (denota anomeridade no caso de polissacarídeos)
Ω	– ômega
Δ	– delta
AGCC	– ácido graxo de cadeia curta
ATCC	– American Type Culture Collection
Ara	– arabinose
BHI	– Brain Heart Infusion
BHT	– Butil-hidroxitolueno
BSA	– albumina soro bovina
CG-EM	– Cromatografia Líquida Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
Da	– daltons
DTA	– Doenças Transmitidas Por Alimentos
DHA	– ácido docosa-hexaenóico
DEPT	– distortionless enhancement by polarization
DMSO	– Dimetilsulfóxido
EPA	– ácido eicoisa-pentaenóico
EtOH	– etanol
Fuc	– fucose
Gal	– galactose
Glc	– glucose
HSQC	– Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy
HPSEC	– High Pressure Size Exclusion Chromatography
IR	– Índice de Refração
MALLS	– Multiangle Laser Light Scattering
Man	– manose
MRS	– Man, Rogosa e Shape
PUFA's	– ácidos graxos poliinsaturados
ppm	– partes por milhão
Rha	– ramnose
RMN ^{13}C	– Ressonância Magnética Nuclear - Carbono 13

RMN ¹ H	– Ressonância Magnética Nuclear - Hidrogênio 1
t_{det}	– tempo de detecção ou tempo de fase lag
$t_{OD=0.1}$	– tempo de detecção secundário
t_{pi}	– ponto de inflexão com a coordenada de tempo
TFA	– ácido trifluoracético
TGI	– trato gastrointestinal
TSB	– tryptone soy broth
TNR	– Terminal não redutor da cadeia polissacarídica
UFC	– unidades formadoras de colônia
Xyl	– xilose

PG	– <i>Pavlova Gyrams</i> (Butcher)
PGAQ	– <i>Pavlova gyrams</i> Aquoso
PGAQ-P	– <i>Pavlova gyrams</i> Aquoso Precipitado
PGAQ-S	– <i>Pavlova gyrams</i> Aquoso Solúvel
PGAQ-SE	– <i>Pavlova gyrams</i> Aquoso Sobrenadante Etanólico
PGAL	– <i>Pavlova gyrams</i> Alcalino
PGAL-P	– <i>Pavlova gyrams</i> Alcalino Precipitado
PGAL-S	– <i>Pavlova gyrams</i> Alcalino Solúvel
PGAL-SE	– <i>Pavlova gyrams</i> Alcalino Sobrenadante Etanólico
PL	– <i>Pavlova lutheri</i> (Droop)
PLAQ	– <i>Pavlova lutheri</i> Aquoso
PLAQ-P	– <i>Pavlova lutheri</i> Aquoso Precipitado
PLAQ-S	– <i>Pavlova lutheri</i> Aquoso Solúvel
PLAQ-SE	– <i>Pavlova lutheri</i> Aquoso Sobrenadante Etanólico
PLAL	– <i>Pavlova lutheri</i> Alcalino
PLAL-P	– <i>Pavlova lutheri</i> Alcalino Precipitado
PLAL-S	– <i>Pavlova lutheri</i> Alcalino Solúvel
PLAL-SE	– <i>Pavlova lutheri</i> Alcalino Sobrenadante Etanólico

Descritas no Capítulo 2 (paper)

GW-s	– Fração aquosa solúvel de gelo-degelo microalga <i>P. gyrams</i>
GW-p	– Fração aquosa precipitada de gelo-degelo microalga <i>P. gyrams</i>

GA-s	– Fração alcalina solúvel de gelo-degelo microalga <i>P. gyrans</i>
GA-p	– Fração alcalina precipitada de gelo-degelo microalga <i>P. gyrans</i>
LW-s	– Fração aquosa solúvel de gelo-degelo microalga <i>P. lutheri</i>
LW-p	– Fração aquosa precipitada de gelo-degelo microalga <i>P. lutheri</i>
LA-s	– Fração alcalina solúvel de gelo-degelo microalga <i>P. lutheri</i>
LA-p	– Fração alcalina precipitada de gelo-degelo microalga <i>P. lutheri</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
2	JUSTIFICATIVA.....	31
3	OBJETIVOS	32
4	ESTRATÉGIAS DE AÇÃO.....	33
	CAPÍTULO 1: CULTIVO DAS MICROALGAS <i>Pavlova gyrams</i> E <i>Pavlova lutheri</i>: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ..	34
1	INTRODUÇÃO	35
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	36
2.1	DIVISÃO HAPTOPHYTA.....	37
2.2	CULTIVO DE MICROALGAS.....	38
2.2.1	Tipos de meios de cultura para microalgas marinhas.....	38
2.2.2	Sistemas de cultivo.....	39
2.2.2.1	<i>Cultivos em batelada ou estanque</i>	39
2.2.2.2	<i>Cultivos semicontínuos</i>	41
2.2.2.3	<i>Cultivos contínuos</i>	41
2.2.3	Métodos de isolamento da biomassa	43
2.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MICROALGAS	44
2.3.1	Polissacarídeos de Microalgas	46
2.3.1.1	<i>Glucanas</i>	46
2.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA DE GLUCANAS	51
2.4.1	Atividade imunomoduladora	51
2.4.2	Resposta imune intestinal.....	52
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1	MICROALGAS.....	53
3.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	53
3.3	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO.....	55
3.4	ISOLAMENTO DAS CÉLULAS.....	56
3.4.1	Centrifugação	56
3.4.2	Floculação	56
3.5	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA.....	57

3.5.1	Determinação de carboidratos totais	57
3.5.2	Determinação de proteínas	57
3.5.3	Determinação de lipídios totais.....	57
3.6	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA MICROALGAL	58
3.6.1	Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e degelo	60
3.7	MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	61
3.7.1	Métodos químicos.....	61
3.7.1.1	<i>Dosagem de açúcares totais.....</i>	60
3.7.1.2	<i>Dosagem de proteínas totais.....</i>	60
3.7.1.3	<i>Hidrólise ácida total.....</i>	60
3.7.1.4	<i>Metilação.....</i>	61
3.7.2	Métodos cromatográficos e espectroscópicos	62
3.7.2.1	<i>Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG- EM).....</i>	61
3.7.2.2	<i>Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC-MALLS-RID).</i>	62
3.7.2.3	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN).....</i>	62
3.8	ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS.....	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	ANÁLISE DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS ESPÉCIES <i>P. gyrans</i> E <i>P. lutheri</i>	64
4.2	ANÁLISE DOS DIFERENTES PROCESSOS DE SEPARAÇÃO DA BIOMASSA E SUA INFLUÊNCIA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA.....	69
4.3	AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS DE <i>Pavlova gyrans</i>	71
4.3.1	Extração e caracterização química dos polissacarídeos	71
4.3.2	Análises de homogeneidade por HPSEC-MALLS-RID	73
4.3.3	Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das frações obtidas da microalga <i>P. gyrans</i>	74
4.3.4	Análise de Metilação.....	88
4.4	AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS DE <i>P. lutheri</i>	89
4.4.1	Extração e caracterização química dos polissacarídeos	89
4.4.2	Análises de homogeneidade por HPSEC-MALLS-RID	91

4.4.3	Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das frações obtidas da microalga <i>P. lutheri</i>	92
4.5	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DE <i>P. lutheri</i> E <i>P. gyrans</i>	103
5	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	114
	CAPÍTULO 2: CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS A <i>Salmonella enterica</i> SV. Typhimurium	125
1	INTRODUÇÃO	126
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	128
2.1	CAPACIDADE DE LIGAÇÃO A PATÓGENOS	128
2.1.2	Mecanismo de adsorção de enterobactérias	128
2.1.3	Processo de adesão	129
2.1.3.1	<i>Fímbrias</i>	129
2.1.4	Mecanismo anti-adesão	131
3	PAPER: MARINE MICROALGAE EXTRACTS AND THEIR BINDING CAPACITY TO <i>Salmonella enterica</i> SV Typhimurium	133
	INTRODUCTION	134
	MATERIALS AND METHODS	135
	RESULTS	140
	DISCUSSION	146
4	CONCLUSÕES	152
	REFERÊNCIAS	154
	CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS MICROALGAS <i>P. gyrans</i> E <i>P. lutheri</i>	163
1	INTRODUÇÃO	164
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	165
2.1	O TRATO GASTROINTESTINAL	165
2.2	A MICROBIOTA DO TRATO GASTROINTESTINAL (TGI)	166
2.2.1	A microbiota intestinal e sua relação com a saúde do hospedeiro	167
2.2.2	Efeitos benéficos dos AGCC produzidos durante a fermentação dos carboidratos sobre a mucosa intestinal	168

2.3	PROBIÓTICOS.....	169
2.3.1	O gênero <i>Lactobacillus</i>	171
2.4	PREBIÓTICOS	172
2.4.1	Os substratos Inulina e Frutoligossacarídeos (FOS)	173
2.5	APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	175
2.6	USOS DE INTERESSE GERAIS DE PREBIÓTICOS	176
3	MATERIAIS E MÉTODOS	177
3.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIOTICA DOS EXTRATOS DE <i>P. lutheri</i> E <i>P. gyrams</i>	177
3.1.1	Microrganismo e condições de cultura	177
3.1.2	Curva de calibração e determinação da densidade óptica do inóculo	178
3.1.3	Inóculo	178
3.1.4	Princípio do método e ensaio	179
3.1.5	Análise dos resultados.....	181
3.1.6	Análise da diminuição de pH	181
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	182
4.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA A PARTIR DA ANALISE DA CURVA DE CRESCIMENTO ...	182
4.1.1	Definição da concentração de inóculo	182
4.1.2	Tratamento do padrão de inulina e das frações microalgais	186
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA DOS EXTRATOS DE MICROALGAS.....	190
4.2.1	Análise da diminuição de pH	197
5	CONCLUSÕES	200
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	201
	PERSPECTIVAS	202
	REFERÊNCIAS	203

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são microrganismos capazes de desenvolver-se tanto em água doce quanto no ambiente marinho, onde constituem o fitoplâncton e são responsáveis por grande parte da atividade fotossintética, absorvendo CO₂ e liberando O₂ e água (DERNER *et al.*, 2006).

Esses organismos possuem uma grande diversidade de estruturas químicas, oriundas de diferentes vias metabólicas, que podem ter as mais variadas aplicações biotecnológicas. Entre as atividades biológicas descritas para os polissacarídeos de microalgas estão: imunoestimulante, antiviral, anti-hiperlipidêmica (DVIR *et al.*, 2009; TALYSHINSKY *et al.*, 2002; BAO *et al.*, 2001; DVIR *et al.*, 2000; BONH e BeMILLER, 1995). Sabe-se que as propriedades biológicas estão diretamente relacionadas à estrutura química destas moléculas como composição monossacarídica, padrões de ligações glicosídicas, presença de grupos substituintes, massa molecular e a conformação. Todos estes são fatores que variam em função da família, gênero e até mesmo espécie a que pertence à microalga. Por este motivo, estes organismos conter teores elevados de moléculas com propriedades biológicas diferenciadas e o potencial de apresentarem propriedades biológicas é tão grande quanto sua variedade de estruturas (TALYSHINSKY *et al.*, 2002; BAO *et al.*, 2001).

Em geral, as microalgas produzem polissacarídeos majoritariamente compostos por glucose (glucanas), que compõem o material de reserva, ou ainda polissacarídeos mais complexos, compostos por diferentes açúcares, constituintes da parede celular. As ligações glicosídicas variam entre as diversas classes, famílias ou divisões as quais pertencem (SPOLAORE *et al.*, 2006; PAINTER, 1983; BROWN, 1991; BROWN *et al.*, 1997). As β-glucanas podem ter ação sobre a microbiota intestinal, devido ao fato de não sofrerem ação das enzimas digestivas. Tais moléculas são denominadas de fibras dietéticas (LAM e CHEUNG, 2013; SLAVIN, 2013).

A microbiota intestinal é formada por centenas de espécies de bactérias benéficas, entre elas as pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*

(esses microrganismos vivos são comercialmente denominados de bactérias probióticas pelos efeitos benéficos que conferem à saúde), que comumente habitam o intestino grosso. As bactérias probióticas desempenham um papel fundamental na saúde do hospedeiro no controle do colesterol e produção de vitaminas, por exemplo (SAAD, 2006; LAPARRA e SANZ, 2010; QUIGLEY, 2010; CRONIN *et al.*, 2011). Além disso, eventualmente bactérias oportunistas colonizam o trato gastrointestinal, devido à contaminação principalmente pelo consumo de produtos de origem animal oriundos de aves, bovinos e suínos, causando infecções gastrointestinais (GAGGIA *et al.*, 2010). Os surtos alimentares, como salmonelose, representam um grande problema de saúde pública. As medidas de controle baseiam-se na prevenção das zoonoses primariamente utilizando-se antibióticos na ração animal, entretanto esta prática nem sempre é eficaz devido à geração de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos, os quais chegaram a ser proibidos pela União Européia a partir de 2006 (PATON *et al.*, 2006; BOROWSKY, 2009; GAGGIA *et al.*, 2010; FERKET, 2011; SHARON e OFEK, 2000; RASKO e SPERANDIO, 2010; SPRING e PRIVULESCU, 2012; SVS, 2014). Por esse motivo, buscam-se novos compostos capazes de controlar a contaminação bacteriana em animais (OFEK *et al.*, 2003).

Recentemente, polissacarídeos com as mais diversas estruturas têm sido estudados quanto à sua capacidade de ligação às enterobactérias, agindo como receptores análogos, impedindo a adesão destes patógenos ao epitélio intestinal do hospedeiro (SHOAF *et al.*, 2006; QUINTERO-VILLEGAS *et al.*, 2013; MALDONADO-GOMEZ *et al.*, 2015). Esta etapa mediada por carboidratos, presentes na superfície das células do tecido gastrointestinal, é fundamental na instalação de infecções entéricas (BECKER *et al.*, 2007; GANNER *et al.*, 2010).

A modulação da microbiota intestinal é dada pela atividade prebiótica (capacidade de estimular o aumento seletivo na concentração de algumas bactérias intestinais benéficas à saúde) de alguns polissacarídeos, os quais quando capazes de passar intactos pela atividade de enzimas digestivas, são fermentados por essas bactérias (GIBSON *et al.*, 1995; GIBSON, 1999; SAAD, 2006; MUSSATTO e MANCILHA, 2007; LICHT *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2011). O polissacarídeo mais estudado por sua atividade prebiótica é a inulina, comumente extraído da raiz de vegetais como a chicória. Este polissacarídeo é constituído por cerca de 50 unidades de frutose β -(1 \rightarrow 2) ligadas, e seus derivados os frutoligossacarídeos,

obtidos a partir da hidrólise química ou enzimática da inulina, também são utilizados como prebióticos (CORRADINI *et al.*, 2004; SAAD, 2006; POMPEI *et al.*, 2008; LICHT *et al.*, 2012). Entretanto, outros polissacarídeos como arabinosilanas pectinas e glucanas vêm sendo estudados quanto a esta propriedade (VARDAKOU *et al.*, 2008; SYNYTSYA *et al.*, 2009; KUDA *et al.*, 2009; WILLIAMS *et al.*, 2011; MADHUKUMAR e MURALIKRISHNA, 2010; RAMNANI *et al.*, 2012).

No ambiente intestinal, o equilíbrio destes diferentes gêneros de bactérias permite ao hospedeiro uma inibição da colonização por bactérias e fungos patogênicos, além de efeitos antitumorais e imunomoduladores (DE MORENO DE LEBLANC *et al.*, 2010; PAGNINI *et al.*, 2010; SLAVIN, 2013). Por esse motivo, a importância do conhecimento de novas moléculas capazes de modular a microbiota intestinal, as quais favorecem a presença de bactérias benéficas e impedem a colonização por patógenos.

Visto que as microalgas apresentam uma elevada variedade de estruturas com alto potencial biotecnológico, e que estas podem ser facilmente obtidas devido a possibilidade de cultivo em larga escala destes microrganismos, este trabalho propõe a avaliação da atividade prébiótica, capacidade de ligação à patógenos e da dos polissacarídeos obtidos de duas espécies de microalgas marinhas pertencentes à divisão Haptophyta, *Pavlova lutheri* (Droop) e *Pavlova gyraus* (Butcher).

Esta tese será apresentada em três capítulos, no primeiro capítulo serão abordados os objetivos e resultados referentes à otimização do cultivo e separação da biomassa microalgal, assim como a obtenção e fracionamento dos extratos das duas espécies de microalgas e a caracterização dos polissacarídeos. No segundo capítulo serão apresentados os objetivos e resultados referentes à capacidade de ligação dos extratos às bactérias patogênicas (em formato de paper a ser submetido para revista científica). No terceiro capítulo serão apresentados os resultados referentes ao estabelecimento do protocolo de análise da atividade prebiótica, assim como os resultados obtidos para os extratos de microalgas.

2 JUSTIFICATIVA

A saúde do trato gastrointestinal (TGI), fator determinante na saúde de um indivíduo, ou mesmo, animal está intimamente ligada às bactérias que o colonizam. Os tipos de bactérias capazes de habitar o TGI, por sua vez, estão diretamente relacionados à dieta, fazendo com que bactérias benéficas e outros organismos patogênicos convivam, competindo por espaço. Quando o balanço é positivo para a colonização por bactérias benéficas, a saúde do hospedeiro é considerada saudável e, quando o inverso ocorre, o hospedeiro está susceptível ao desenvolvimento de infecções.

Algumas moléculas como os carboidratos, têm mostrado potencial inerente de modular as bactérias que habitam o TGI. Os carboidratos podem ser fermentados por bactérias benéficas, multiplicando o número desses organismos no TGI de hospedeiros (prebióticos), ou ainda podem agir inibindo a adesão de bactérias patogênicas às células do TGI, etapa fundamental no estabelecimento de doenças no hospedeiro. Alguns polissacarídeos que exibem essas propriedades de modulação já têm suas estruturas químicas bem conhecidas. Entretanto, estudos recentes têm mostrado que estruturas muito variadas e diferentes das já conhecidas podem também apresentar potencial prebiótico e/ou de ligação a bactérias enteropatogênicas. Este, portanto, compreende um vasto campo de pesquisa ainda pouco explorado e muito requerido tanto pela indústria de ração animal, que visa melhorar o perfil de crescimento de animais de criação, quanto na saúde humana.

Uma vez que a estrutura química fina dos polissacarídeos é determinante para que os mesmos apresentem determinadas atividades biológicas, e que as microalgas são organismos produtores das mais variadas estruturas polissacarídicas, além de serem cultiváveis em larga escala para obtenção de tais compostos, esta pesquisa torna-se de alta relevância para a descoberta de uma nova fonte de moléculas capazes de modular a microbiota intestinal.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral extrair e caracterizar a estrutura química dos polissacarídeos presentes na microalga de *Pavlova lutheri* e *P. gyrams*, e avaliar o potencial prebiótico *in vitro*, bem como sua capacidade de adesão à bactérias patogênicas, obtendo, assim, um panorama geral da atividade de sua atividade sobre a microbiota intestinal.

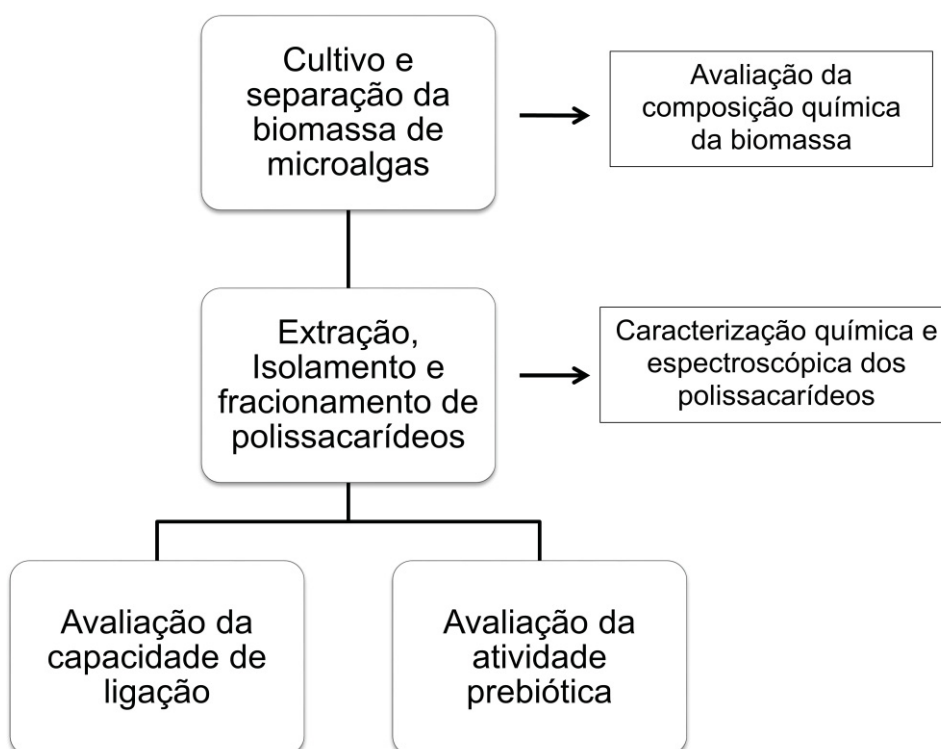
Neste contexto estabelecem-se os seguintes objetivos específicos:

- cultivar as microalgas para produção de biomassa;
- estabelecer o melhor processo para separação da biomassa microalgal;
- avaliar o rendimento e a composição da biomassa (carboidratos totais, proteínas e lipídios totais) obtida por diferentes processos de separação;
- extrair, isolar e purificar os polissacarídeos das espécies de microalgas *P. gyrams* e *P. lutheri*;
- determinar, por métodos químicos e espectroscópicos a estrutura dos polissacarídeos;
- avaliar a capacidade de ligação a patógenos *in vitro* dos polissacarídeos isolados;
- avaliar a atividade prebiótica *in vitro* dos polissacarídeos de *P. gyrams* e *P. lutheri*.

4 ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

O primeiro passo na estratégia de ação deste trabalho foi o cultivo das microalgas *P. lutheri* e *P. gyrans* seguido pela separação da biomassa. A partir da biomassa liofilizada, foram feitas duas extrações sequenciais aquosas e uma alcalina para obtenção dos polissacarídeos. Estes extratos foram caracterizados química e espectroscopicamente (resultados apresentados no capítulo 1), testados quanto à sua capacidade de ligação a bactérias enteropatogênicas (resultados apresentados no capítulo 2) e atividade prebiótica (resultados apresentados no capítulo 3).

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE AÇÃO



**CAPÍTULO 1: CULTIVO DAS MICROALGAS *Pavlova gyrams* E *Pavlova lutheri*:
EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS**

1 INTRODUÇÃO

Microalgas são organismos microscópicos, fotoautotróficos que apresentam um metabolismo similar ao das plantas superiores, visto que estas evoluíram de clorófitas. São normalmente divididos de acordo com os tipos de pigmentos fotossintéticos que apresentam, entre outras características (DERNER *et al.*, 2006). Podem ser unicelulares, coloniais ou filamentosos (OLAIZOLA, 2003) e são capazes de desenvolver-se tanto em ambiente marinho, como em água doce e no solo (CHISTI, 2004).

As microalgas podem ser procarióticas ou eucarióticas. As procarióticas encontram-se no grupo das Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta. As eucarióticas pertencem principalmente às classes Bacillariophyceae (diatomáceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (cocolitoforídeos) e Cryptophyceae (criptomônadas), além Prasinophyceae e Chlorophyceae (algas verdes) (YONEDA, 1999). Estes organismos juntamente com as macroalgas constituem um total de 25 a 30 mil espécies com uma grande diversidade de formas e tamanhos (PLAZA *et al.*, 2008).

De acordo com PLAZA *et al.* (2008) as algas, em geral, já são consideradas como uma boa alternativa aos compostos químicos sintéticos. Isso se deve ao grande número de espécies, facilidade de cultivo, crescimento relativamente rápido (quando comparado a macroalgas e vegetais superiores), e a possibilidade de se controlar a produção de alguns compostos bioativos pela manipulação das condições de cultivo das microalgas.

Alguns desses organismos são submetidos à condições extremas em seus habitats naturais, como mudanças drásticas de salinidade, temperatura, nutrientes e irradiação ultravioleta, por isso tornaram-se capazes de adaptar-se rapidamente às condições do ambiente para sobreviver, produzindo uma grande variedade de metabólitos secundários, biologicamente ativos, os quais não são encontrados em outros organismos (PLAZA *et al.*, 2008). Diversos grupos de algas pertencentes ao fitoplâncton não apresentam relações filogenéticas entre si, exibindo diferenças expressivas, que se manifestam em seus produtos de reserva, pigmentos fotossintetizantes acessórios e substâncias constituintes da parede celular (LOURENÇO, 2006).

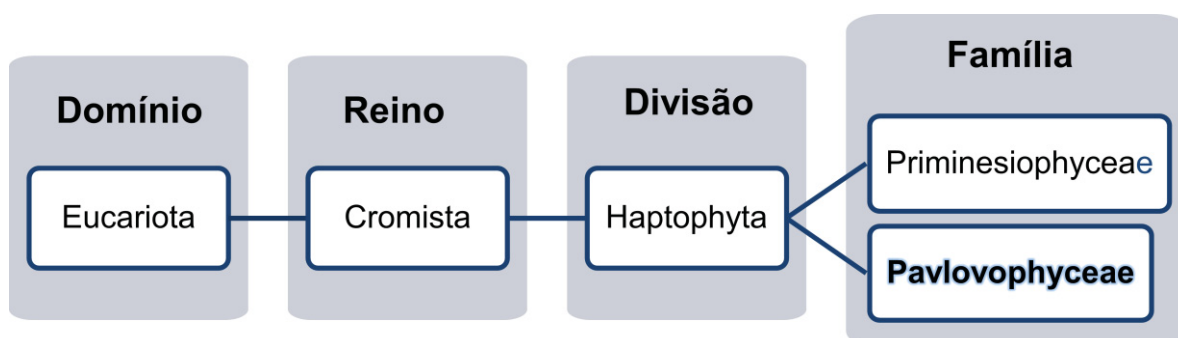
Microalgas têm recebido maior atenção nos últimos anos, principalmente pelo seu conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, carotenóides e outros pigmentos (com ação antioxidante), polissacarídeos sulfatados (descritos em geral como antivirais, ou ainda, antitumorais e anti-inflamatórios), esteróis (antimicrobianos), além do interesse na sua biomassa para produção de biodiesel (MINKOVA *et al.*, 1996; MATSUI *et al.*, 2003; CHISTI, 2004; HERRERO *et al.*, 2006; GARDEVA *et al.*, 2009; PLAZA *et al.*, 2010) e glucanas (imunoestimulantes) (SUÁREZ *et al.*, 2006).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As microalgas são classificadas de acordo com critérios morfológicos, - como a presença de flagelos, químicos - como os constituintes da parede celular e, os tipos de produtos de reserva e moleculares. Embora estes organismos pertençam a divisões taxonômicas muito distintas devido a suas diferenças estruturais e morfológicas, fisiologicamente são muito semelhantes.

As espécies utilizadas neste trabalho pertencem a divisão haptophyta, a qual conta com mais de 300 espécies marinhas. A seguir serão descritas as principais características desta divisão.

FIGURA 2 - DIVISÃO TAXONÔMICA A QUE PERTENCE O MATERIAL DE ESTUDO



FONTE: ALGAEBASE (2014).

2.1 DIVISÃO HAPTOPHYTA

Na divisão Haptophyta encontram-se organismos unicelulares móveis, ou em forma de agregados sem mobilidade. A principal característica é a presença de uma estrutura curta em forma de fio, conhecida como haptonema, situada entre dois flagelos desiguais. Ainda não se tem conhecimento de sua função celular exata, sendo considerada como estrutura vestigial ou orientando o movimento das células pela busca de nutrientes (NICHOLLS, 2002; LOURENÇO, 2006; BENDIF *et al.*, 2011).

Os pigmentos em geral são: clorofila *a*, clorofila *c1*, clorofila *c2*, e carotenóides como fucoxantina (e seus derivados), β -caroteno, diadinoxantina, diatoxantina. A grande concentração de carotenóides confere aos membros desse grupo uma coloração amarelada em tons de dourado ou marrom. A presença de clorofila *c* deve estar diretamente relacionada com sua via biossintética diferenciada da clorofila *a* e *b*, apresentando-se como um intermediário na transferência de energia entre clorofila *a* e carotenoides (LOURENÇO, 2006).

A divisão Haptophyta possui duas famílias: a Prymnesiophyceae, representada principalmente pelo gênero *Isochrysis* e a Pavlovophyceae, representada principalmente pelo gênero *Pavlova*, seguido dos gêneros *Diacronema*, *Exanthemachrysis* e *Rebecca* (NICHOLLS, 2002; REVIERS, 2006; LOURENÇO, 2006; BENDIFF *et al.*, 2011).

FIGURA 3 - FOTO DE *Pavlova lutheri*



FONTE: O autor (2010).

Algumas espécies da classe Primnesiophyceae são produtoras de toxinas. Em geral são espécies de água doce e a expressão de toxicidade pode variar de

acordo com a exposição a determinados fatores ambientais e condições de crescimento, como deficiência de fósforo no meio (BENDIFF *et al.*, 2011).

As espécies pertencentes à classe Pavlovophyceae são conhecidas por sintetizarem ácidos graxos de cadeia longa polinsaturados como DHA (ácido docosahexaenóico ω -3) e EPA (ácido eicosapentaenóico ω -6), de elevado interesse comercial, e também pela sua capacidade de produção em larga escala, visto que espécies como *P. lutheri* e *P. gyrans* são extensivamente usadas na aquicultura como alimentação para peixes e crustáceos. Além disso, estas espécies sintetizam certos esteróis e derivados específicos como os pavlovóis e apresentam grânulos de estoque intracelular de carboidratos (LOURENÇO, 2006).

Na secção seguinte é descrito como é realizado o cultivo de microalgas e as principais variáveis relacionadas ao crescimento das culturas.

2.2 CULTIVO DE MICROALGAS

Tanto em ambiente natural como em cultivos, o desenvolvimento das microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, os quais se referem à taxa metabólica própria de cada organismo e físico-químicos como iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes. A disponibilidade de nutrientes está ligada ao tipo de meio de cultura empregado no cultivo de microalgas, os quais são abordados a seguir.

2.2.1 Tipos de meios de cultura para microalgas marinhas

Os meios de cultura são a fonte de todos os elementos constituintes dos organismos, e necessários para promover o seu desenvolvimento. A composição do meio de cultivo varia de acordo com a necessidade de cada espécie, por esse motivo não existe um meio padrão para o crescimento de todas as microalgas (COUTTEAU, 1996; LOURENÇO, 2006).

Além de nutrientes, as microalgas precisam de luz para seu desenvolvimento, visto sua característica fotossintetizante. As microalgas que comumente habitam o ambiente marinho tem na água do mar um meio ideal

extremamente complexo e, por isso, também de difícil reprodução, já que apresenta dezenas de elementos químicos, em sua maioria presentes na forma de sais inorgânicos ionizados e diversos compostos orgânicos em concentração variável. Entretanto, muitos elementos estão presentes em quantidades insuficientes para o cultivo de microalgas, principalmente em larga escala. Dessa forma, muitos meios de cultura empregam a água do mar enriquecida com certos nutrientes necessários em quantidades maiores, ou ainda meios totalmente artificiais (GUILLARD, 1975; LOURENÇO, 2006).

Há três classes principais de meios de cultura utilizados para o desenvolvimento de microalgas marinhas: meios de cultura definidos, semidefinidos e indefinidos. O meio de cultura definido é preparado a partir de água pura, ao qual são adicionados todos os sais e nutrientes necessários (neste caso a composição é totalmente conhecida). O meio de cultura semidefinido utiliza água do mar como “base”, à qual são adicionados os nutrientes em quantidades determinadas. Entretanto, como a composição da água marinha é variável não é possível definir exatamente a composição final. Os meios indefinidos são preparados a partir da mistura de água do mar e uma solução de substâncias orgânicas e inorgânicas, onde se sabe que estão presentes nutrientes, os quais são estimulantes do crescimento de microalgas. Contudo não se sabe quais, nem em que concentração (GUILLARD, 1975; LOURENÇO, 2006).

Os sistemas de cultivo utilizados para produzir microalgas podem variar de acordo, por exemplo, com a finalidade da biomassa (manutenção de cepas em laboratório, pesquisa, ou ainda para fins comerciais). São três os sistemas básicos utilizados para manutenção de culturas: batelada, semicontínuo e contínuo descritos a seguir.

2.2.2 Sistemas de cultivo

O cultivo de microalgas pode ocorrer em escala de bancada, para produção de pequenas quantidades de biomassa, ou ainda para produção em larga escala os chamados cultivos em massa com finalidade biotecnológica ou para aquicultura.

A produção massiva pode ser realizada em sistemas abertos ou fechados. Os sistemas abertos, geralmente, são realizados em tanques rasos e de grandes

áreas, para maior aproveitamento da luz solar, ou ainda tanques acrílicos ou de fibra de vidro. Entretanto, nestes o crescimento em geral é mais lento devido à dificuldade de distribuir a cultura pelo tanque e, também aos efeitos do auto-sombreamento. O cultivo em tanques abertos tem baixo custo de manutenção, porém apresenta alta recorrência de contaminação e dificuldade no controle das condições ambientais como luz e temperatura (SUH e LEE, 2003; LOURENÇO, 2006; CHISTI, 2007).

Em sistemas fechados as culturas são acondicionadas em sacos plásticos simples ou fotobiorreatores que podem ter centenas de metros de extensão, pode-se optar por utilizar luz natural ou artificial. Este tipo de cultivo tende a ser mais caro, porém, a biomassa obtida em geral apresenta melhor qualidade (PULZ, 2001; SUH e LEE, 2003; CHISTI, 2007).

Há quatro formas principais de se cultivar microalgas, as quais independem do volume de produção, podendo ser utilizadas em cultivos que variam de poucos mililitros à centenas de litros. A escolha do tipo de cultivo a ser realizado é baseada principalmente no aproveitamento da biomassa, rendimento da produção e custos envolvidos na operação (LOURENÇO, 2006).

2.2.2.1 Cultivos em batelada ou estanque

Neste tipo de cultivo, um meio de cultura fresco é inoculado e, durante todo o tempo de desenvolvimento do cultivo, nenhum componente do meio é renovado, mesmo que haja remoção total ou parcial de volumes do cultivo. Nos primeiros dias de cultivo essa condição leva a um grande aumento do número de células, devido à disponibilidade de nutrientes e luz, os quais com o passar do tempo vão se esgotando até a completa exaustão. Durante o crescimento, de maneira geral é possível observar diferentes fases, quando se compara a densidade de células ao longo do tempo (COUTTEAU, 1996; LOURENÇO, 2006).

A primeira fase chamada de fase lag ou de adaptação ocorre logo após a inoculação do meio de cultura fresco. Esta fase é marcada pela adaptação das células ao novo ambiente. Na fase seguinte ocorre a maior taxa de crescimento das microalgas. É conhecida como fase exponencial ou logarítmica e seu período varia em função da espécie e das condições de crescimento da cultura como concentração de nutrientes, pH dos cultivos, temperatura, intensidade e qualidade

da luz, uso de aeração, etc. A exaustão de qualquer dos componentes do meio ou a elevada densidade celular (auto-sombreamento), podem levar a redução da taxa de crescimento ou mesmo a eliminação da fase logarítmica, fazendo com que as células consumam suas reservas endógenas. Do início ao final da fase logarítmica as células podem passar por diversas alterações fisiológicas e bioquímicas em decorrência da interação com o meio. Ao fim desta fase é onde se obtém o maior rendimento de biomassa, com características celulares ainda favoráveis. Quando a taxa de crescimento diminui e torna-se estável a cultura atinge a fase estacionária de crescimento. Onde a taxa de morte de células é praticamente igual a taxa de crescimento, comparando-se a um platô em representações esquemáticas das fases. Nesta fase os nutrientes esgotam-se por completo e o efeito do auto-sombreamento é máximo, culminando com o início da fase de declínio ou de morte, período em que a taxa de crescimento é negativa (LOURENÇO, 2006).

Todas as mudanças de fases dos cultivos de microalgas são acompanhadas por alterações fisiológicas e bioquímicas nas células. Proteínas e nitrogênio total tendem a ser mais abundantes nas células na fase exponencial de crescimento, quando todos os nutrientes estão dissolvidos no meio de cultura em concentrações ótimas. Já na fase estacionária pode haver uma redução, o que leva a uma diminuição também no teor de proteínas. Substâncias como carboidratos e lipídios tendem a ser mais abundantes em cultivos mais velhos, ou seja, na fase estacionária (LOURENÇO *et al.*, 2004) devido à alta demanda de energia ocorrida ainda fase exponencial (EMDADI e BERLAND, 1989; REIREZ *et al.*; 1989).

Os cultivos em batelada são comumente utilizados em laboratórios de pesquisa e na manutenção de cepários, para fins comerciais como na produção de biomassa para aquicultura ou para extração de substâncias bioativas. A produção para essas finalidades, em geral, não experimenta todas as fases de crescimento, as culturas são levadas até o período de transição entre a fase logarítmica e estacionária, onde se observa maior rendimento de biomassa com células saudáveis (LOURENÇO, 2006).

2.2.2.2 Cultivos semicontínuos

Nesse tipo de cultivo uma parcela da cultura é removida periodicamente e substituída por meio de cultivo novo, esse processo pode se repetir indefinidamente e em qualquer fase do cultivo, entretanto, habitualmente, se realiza quando a cultura já apresenta um número razoável de células. Nesse sistema se propicia a produção de um grande número de células por intervalo de tempo, a coleta sempre de culturas ainda jovens favorece células em um estado fisiológico muito favorável, e impede que as culturas sofram com quaisquer fatores limitantes do crescimento, por estarem sempre se renovando com meios de cultura novos. A diluição dos cultivos é programada sempre em função da taxa de crescimento. Essas características levaram a concepção atual de sistemas de alta produtividade de microalgas. Como desvantagem esse sistema apresenta alta recorrência de contaminação. Devido a manipulação frequente, as culturas ficam expostas a bactérias e outros microrganismos (CAMACHO *et al.*, 1999; LOURENÇO, 2006).

O uso desses cultivos se dá principalmente para obtenção de biomassa para fins comerciais ou de pesquisa de compostos presentes em quantidades muito baixas na biomassa (LOURENÇO, 2006).

2.2.2.3 Cultivos contínuos

Nesse sistema de cultivo a entrada de meio esterilizado e saída de parte do meio de cultura ocorre continuamente, gerando-se um fluxo contínuo e permitindo o equilíbrio dinâmico entre os volumes que entram e saem da cultura por unidade de tempo. Para realização deste sistema é necessário um aparelho capaz de determinar ou a densidade celular (turbidostato), ou a concentração dos nutrientes no meio de cultura (quimiostato). A partir dos registros contínuos, pode-se estabelecer o fluxo de saída de pequenos volumes de cultura ou a entrada de meio de cultura. Tanto a concentração de células quanto de nutrientes é mantida constante. A cultura pode atingir o estado estacionário, no qual pode se manter por longo período de tempo, obtendo alta quantidade de biomassa de boa qualidade (LOURENÇO, 2006; MATA *et al.*, 2009).

Devido ao alto custo envolvido neste sistema, os mesmos vêm sendo viabilizados para o uso em nível comercial em função do desenvolvimento de aplicações biotecnológicas do cultivo de microalgas (LOURENÇO, 2006).

2.2.3 Métodos de isolamento da biomassa

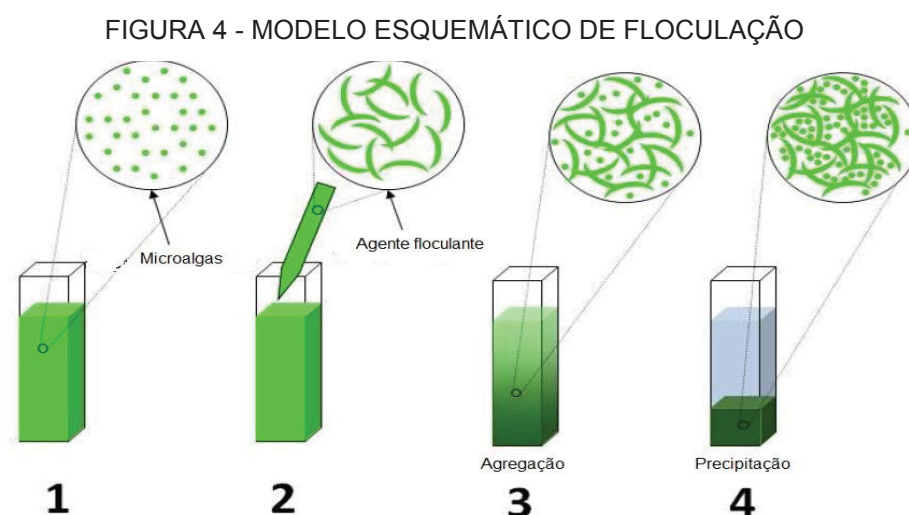
A separação das células do meio de cultura pode representar etapa laboriosa, longa ou mesmo cara, dependendo do método e dos volumes envolvidos. Para a separação de pequenos volumes de cultura o método mais simples e eficiente é a filtração, porém em média e grande escala esse processo torna-se inviável. Outros métodos como centrifugação e floculação são empregados nestes casos.

A centrifugação é um processo simples, onde é possível concentrar a biomassa sem adição de produtos químicos e, portanto, conservar suas características originais. Parâmetros como velocidade e tempo de centrifugação devem ser determinados em função das características da espécie de interesse e do volume de cultura. Em cultivos massivos a separação por centrifugação encarece o processo, devido aos gastos significativos de energia associados ao uso destes equipamentos, tornando essa metodologia muitas vezes inviável em escala comercial. Deve-se levar em consideração, também, o valor agregado à finalidade da biomassa produzida para avaliar o emprego desta metodologia em larga escala (GRIMA *et al.*, 2003; LOURENÇO, 2006; VANDAMME *et al.*, 2013).

O processo de floculação consiste na capacidade de estimular as células, que normalmente permanecem em suspensão, a formarem flocos capazes de decantar. Esse sistema é bastante útil em cultivos de larga escala, pois concentra os cultivos em volumes menores que podem ser posteriormente centrifugados para remoção total do meio de cultivo (GRIMA *et al.*, 2003; LOURENÇO, 2006).

A floculação pode ser induzida pela introdução de uma corrente elétrica na cultura, as algas formam flocos que boiam e podem ser recolhidos. Entretanto, a forma mais simples é por meio de processos químicos, pela adição de agentes floculantes e estes podem ser orgânicos ou inorgânicos. Entre os inorgânicos são exemplos as bases ou ácidos fortes, como NaOH e HCl ou sais inorgânicos (sulfato de alumínio, sulfato férrico e cloreto férrico). Esses agentes são capazes de

promover alterações drásticas de pH da cultura, promovendo a agregação das células que estão em suspensão (VANDAMME *et al.*, 2013; LOURENÇO, 2006). A agregação pode ocorrer ainda por interações iônicas entre as cargas do flocculante e das células (T LAM *et al.*, 2014; GARG *et al.*, 2012). Altas concentrações dos agentes químicos podem causar danos às células, por esse motivo são adicionadas as menores quantidades possíveis. Na sequência, é realizada agitação vigorosa do sistema até que se formem agregados visíveis a olho nu, seguido-se de repouso para sedimentação dos agregados (LOURENÇO, 2006).



FONTE: Adaptado de SALIM *et al.* (2010)

A floculação é um processo simples, porém envolve gastos relacionados ao uso dos flocculantes químicos e a contaminação da biomassa podendo alterá-la quimicamente de forma significativa (VANDAMME *et al.*, 2013; LOURENÇO, 2006).

A biomassa obtida por meio de floculação ou centrifugação pode ser imediatamente submetida ao processo de secagem em estufa, *spray-drier* ou liofilização, de acordo com a finalidade.

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MICROALGAS

Microalgas são comumente utilizadas em aquicultura e em alguns casos, também, para encapsulamento e produção de suplementos alimentares para humanos. Isso se deve, principalmente, a sua composição nutricional com elevados

teores de proteínas, lipídios e carboidratos, principalmente, mas também aos compostos do metabolismo secundário de grande importância para a nutrição animal (SPOLAORE *et al.*, 2006; PLAZA *et al.*, 2008).

Microalgas são uma boa fonte de vitaminas e minerais, entre elas tiamina, riboflavina, cianocobalamina, biotina, ácido ascórbico, ácido fólico, β -caroteno e α -tocoferol (PULZ e GROSS, 2004), sendo este último um dos mais abundantes na espécie *Pavlova lutheri* (SEGUINEAU *et al.*, 1996). Com relação aos minerais, o percentual em relação à massa seca geralmente é avaliado pelo conteúdo de cinzas, que é o material inorgânico resultante do tratamento da biomassa em temperaturas de até 600 °C (LOURENÇO, 2006), o qual pode variar entre 6-39 % em diferentes espécies (RENAUD *et al.*, 1999; BROWN, 1991; BROWN *et al.* (1989 citado por LOURENÇO, 2006)).

As proteínas tendem a ser a classe de substâncias mais abundante na maioria das espécies de microalgas (SPOLAORE *et al.*, 2006) correspondendo de 12 a 57 % do massa seca (RENAUD *et al.*, 1999; BROWN *et al.*, 1997; BROWN, 1991). Na microalga *Pavlova lutheri* BROWN *et al.* (1989 citado por LOURENÇO, 2006) determinaram que 49 % do massa seca da biomassa corresponde à proteínas, sendo que outras espécies de haptophytas apresentam em média 30 % deste macronutriente (RENAUD *et al.*, 1999; BROWN, 1991). Em geral, o perfil de aminoácidos de quase todas as espécies destes organismos é comparável ao de proteínas vegetais, inclusive aqueles essenciais aos animais (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Os lipídios possuem importantes funções fisiológicas como componentes estruturais, produtos de reserva e reguladores da flutuação em colunas d'água (LOURENÇO, 2006). Seu teor varia de acordo com condições ambientais e nutricionais, como limitação de nitrogênio, por esse motivo maiores teores de lipídios tendem a ser observados em cultivos mais antigos que atingiram a fase exponencial de desenvolvimento (VALENZUELA-ESPINOZA *et al.*, 2002). O conteúdo de lipídios também varia entre os grupos taxonômicos, em microalgas da divisão haptophyta foi encontrado o maior teor de lipídios dentre outras espécies de 17,1 % em média (RENAUD *et al.*, 1999; BROWN, 1991). As haptophytas, também fazem parte de um grupo de microalgas com alto teor de ácidos graxos de cadeia poliinsaturada EPA e DHA, de especial importância comercial (LIU e LIN, 2001).

Os carboidratos fazem parte dos produtos de reserva das microalgas, sendo que os maiores conteúdos, de acordo com RENAUD *et al.* (1999), ocorrem em rodófitas, cerca de 20 %, enquanto espécies da divisão Haptophyta apresentaram em média 11,6 % e outras espécies como as diatomáceas e as criptofíceas apresentaram valores bem menores, próximos a 7 %. Com relação a composição monossacarídica, a glucose é o açúcar predominante variando de 21 a 87 %. Entretanto, também foram detectadas concentrações variáveis de outros monossacarídeos como galactose, manose, arabinose, xilose e fucose (BROWN *et al.*, 1997). A síntese de carboidratos pelas microalgas, de maneira geral, está associada com a limitação de nitrogênio que diminui a síntese de proteínas e favorece o acúmulo dos produtos de reserva (AIDAR *et al.*, 1991; LOURENÇO *et al.* 1997).

2.3.1 Polissacarídeos de Microalgas

Polissacarídeos são macromoléculas presentes em todos os seres vivos. O termo polissacarídeo refere-se aos polímeros com mais de 20 unidades monossacarídicas ligadas por ligações glicosídicas, que podem formar cadeias de centenas de monossacarídeos. Esses polímeros têm funções reconhecidas como elementos estruturais de paredes celulares, material de reserva suprindo o metabolismo energético, na matriz extracelular fornecendo proteção e suporte para células e tecidos, entre outras (ASPINALL, 1970).

Devido à grande diversidade de microalgas, a composição dos polissacarídeos tem acentuadas diferenças entre espécies e classes (PAINTER, 1983; BROWN, 1991). A composição de carboidratos, especialmente seu conteúdo de glucose, pode variar de acordo com fatores ambientais e o período de crescimento (RIJSSEL *et al.*, 2000).

Os polissacarídeos encontrados em microalgas podem ser armazenados como material de reserva. Em geral, são constituídos principalmente por glucose, sendo, portanto, denominados de glucanas. Também, são descritos polissacarídeos com função estrutural, os quais apresentam diversos padrões estruturais de ligações glicosídicas, ramificações e composição monossacarídica (BROWN, 1991; MYKLESTAD e HAUG, 1972). Dentre as glucanas encontradas em microalgas,

podem ser citadas as glucanas α -(1 \rightarrow 4), denominadas amilopectina ou amilose, dependendo da presença ou não de ramificações, respectivamente. Entretanto, também foram observadas em algumas espécies glucanas β -(1 \rightarrow 3) ligadas lineares e ramificadas (PAINTER, 1983; GRANUM e MYKLESTAD, 2002; FRANCESCHINI *et al.*, 2010). Isto indica que podem ocorrer grandes variações na estrutura e conformação das cadeias de polissacarídeos encontradas nestes organismos, em função da classe a que pertencem.

2.3.1.1 Glucanas

As β -glucanas (1 \rightarrow 3)-ligadas, lineares ou não, podem apresentar diversas nomenclaturas específicas, de acordo com a espécie em questão (QUADRO 1). O termo *paramylon*, por exemplo, aplica-se aos grânulos intracelulares de β -glucanas-(1 \rightarrow 3)-ligadas, não ramificadas, estocadas no interior das células de microalgas mixotróficas do gênero *Euglena* (Divisão Euglenozoa). Nestes organismos este polissacarídeo apresenta alta massa molecular e organiza-se na forma de cristais (CLARKE e STONE, 1960). KREGER e VAN DER VEER (1970, citado por STONE, 2009) detectaram na microalga *Pavlova mesolychnon* grânulos citoplasmáticos que apresentaram o mesmo padrão de difração de raio-X do paramylon. *Curdlan* é a denominação utilizada para os polímeros de mesma estrutura, com até 12 mil unidades de glucose, produzidos por bactérias não patogênicas de solo (MARCHESSAULT e DESLANDS, 1979). Este polímero é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, mas é solúvel em base (NaOH 0,25 M) e DMSO. Em fungos basidiomicetos o componente majoritário da estrutura de escleródios (um tipo estrutura de resistência dos fungos), são as glucanas β -(1 \rightarrow 3)-ligadas insolúveis conhecidas como *pachyman* (HOFFMAN *et al.*, 1991). Alguns vegetais superiores também podem apresentar a síntese e o acúmulo deste polímero, quando em stress fisiológico ou em divisão celular, sob a denominação de *callose* (STONE, 2009).

As glucanas ramificadas β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-ligadas são encontradas como estoque intracelular de polissacarídeos em algas marrons, diatomáceas e na parede celular de fungos basidiomicetos e ascomicetos. Em algas marrons, esses polímeros são conhecidos como *laminaranas* e apresentam cadeias relativamente curtas com

grau de polimerização que varia em média de 31 a 40, substituídas ocasionalmente por ligações β -(1 \rightarrow 6). O baixo grau de polimerização associado ao alto grau de ramificação torna essas moléculas altamente solúveis em água (STONE, 2009). O mesmo polímero observado em crisófitas é conhecido como *crisolaminarana*, estas apresentam grau de substituição bem inferior, sendo apenas cerca de uma unidade de glucose ramificada para cada dez unidades da cadeia principal β -(1 \rightarrow 3)-ligada (STONE, 2009). Nas diatomáceas, um polímero muito similar as crisolaminaranas, exceto pela possibilidade de apresentar também substituições em O-2, é conhecido como *leucosin* (STONE, 2009). Um resumo das fontes e nomes comuns de cada tipo estrutural é encontrado no QUADRO 1.

QUADRO 1 - NOMES USUAIS DE β -GLUCANAS LINEARES E RAMIFICADAS OBTIDAS DE DIFERENTES FONTES

<i>Tipo estrutural</i>	<i>Nome comum</i>	<i>Fonte</i>
Glucana β -(1 \rightarrow 3) linear	<i>Curdlan</i>	Bactéria
	<i>Paramylon</i>	Euglenóides e Haptophyta
	<i>Pachyman</i>	Fungos e Líquens
	<i>Callose</i>	Embriófitas
Glucana β -(1 \rightarrow 3) linear com ramificação em β -(1 \rightarrow 6) por TNR de glucose ou cadeias laterais de glcp β -(1 \rightarrow 6) ligadas	Laminaranas	Cromistas e Phaeophyta
	Micolaminaranas	Oomycetes
	Crisolaminaranas	Crysophyta
	<i>Leucosin</i>	Diatomáceas
	<i>Grifolan</i>	Fungos
	<i>Lentinan</i>	
	<i>Schizophyllan</i>	

Fonte: Adaptado de STONE (2009).

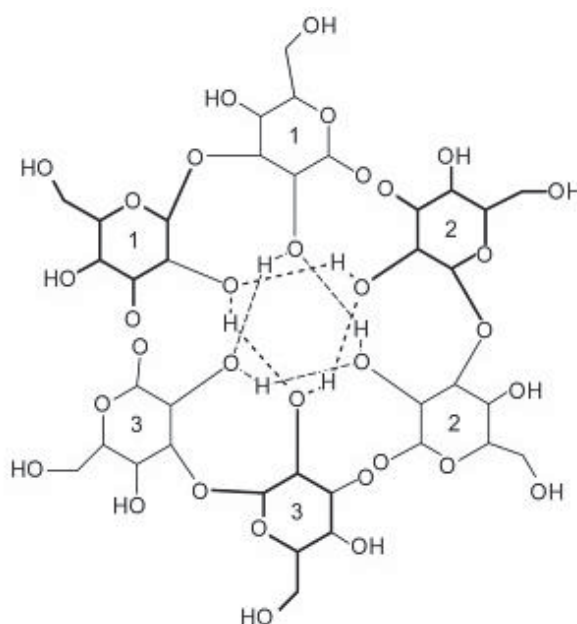
As propriedades físico-químicas de polissacarídeos estão totalmente relacionadas ao seu tamanho molecular, origem biológica, histórico de temperatura e solventes utilizados na extração (GIDLEY E NISHINARI, 2009). Acredita-se que os efeitos biológicos sejam influenciados pelo grau de ramificação, tamanho da cadeia e estrutura terciária (SLETMOEN e STROKKE, 2008). O tipo de ligação glicosídica entre os açúcares interfere também nas características físico-químicas de polissacarídeos (GIDLEY E NISHINARI, 2009). O anel de seis membros em formato de cadeira é bastante rígido, por isso a maior parte da flexibilidade de uma cadeia

polissacarídica provém das rotações em torno da ligação glicosídica (SLETMOEN e STROKKE, 2008).

A estrutura repetitiva na cadeia de β -glucanas (1 \rightarrow 3)-ligadas, por exemplo, gera uma torção na cadeia, por isto a maior parte destes polímeros tem a tendência de formar cadeias em hélice e cada volta tem pelo menos seis unidades de glucose (GIDLEY E NISHINARI, 2009). A estrutura em tripla hélice das cadeias de β -glucanas -(1 \rightarrow 3)-ligadas já foi confirmada por experimentos de difração de raios x (CHUAH *et al.*, 1983), RMN de ^{13}C de estado sólido (YOSHIOKA *et al.*, 1985), espalhamento de luz laser multiângulos (KULICKE *et al.*, 1997), transferência ressonante de energia de fluorescência (YOUNG *et al.*, 2000), e simulação de dinâmica molecular (OKOBIRA *et al.*, 2008). Essas hélices únicas podem tornar-se mais estáveis pela interação com outras cadeias de glucanas β -(1 \rightarrow 3)-ligadas, através de pontes de hidrogênio entre as hidroxilas do C-2 que estão voltadas para o interior da hélice (FIGURA 5). As hidroxilas do C-6 estão voltadas para a face exterior da hélice e no caso de estarem substituídas por unidades de glucose, tornam essa estrutura mais hidrofílica, enquanto o interior é altamente hidrofóbico (SLETMOEN e STROKKE, 2008).

Os triplex podem ser desnaturados em solução alcalina ($\text{NaOH} \geq 0,25 \text{ M}$) e devido a elevação do pH essas cadeias dissociam-se, devido ao grande aumento de cargas entre as “fitas” levando a repulsão eletrostática, ou em DMSO devido às propriedades desse solvente (SLETMOEN e STROKKE, 2008).

FIGURA 5 - MODELO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA EM HÉLICE DE D-GLUCANAS β -(1 \rightarrow 3) LIGADAS



FONTE: MIYOSHI *et al.* (2004)

Dentre as atividades biológicas descritas, para este tipo de glucanas, encontra-se atividades imunomoduladora, antiviral, antitumoral, antibacteriana e anticoagulante, entre outras (BOHN e BeMILLER, 1995). As quais estão diretamente relacionadas com as características estruturais e físico-químicas anteriormente descritas.

O estudo dos polissacarídeos de microalgas da divisão Haptophyta, família Prminesiophyceae como a *Isochrysis galbana* e *Emiliana huxleyi* mostrou polissacarídeos constituídos por glucose e de cadeia principal β -(1 \rightarrow 6) ligada com substituições em O-3, por dissacarídeos de glucose ligados β -(1 \rightarrow 3) no caso de *I. galbana* (RIZZI, 2010) e por di ou trissacarídeos de glucose ligados em β -(1 \rightarrow 6) no caso de *E. huxleyi* (VARUM *et al.*, 1986).

Não foram encontrados na literatura dados específicos sobre os polissacarídeos produzidos pelas espécies integrantes da família Pavlovaceae tanto do gênero *Pavlova* quanto de outros gêneros como *Diacronema* e *Exanthemachrysis*.

2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE GLUCANAS

As glucanas obtidas de diversas fontes apresentam muitas atividades biológicas tais como, antitumorais (SILVA *et al.*, 2006; SYNYTSYA *et al.*, 2009) antiinflamatória, analgésica (SMIDERLE *et al.*, 2008), diminuição do colesterol sanguíneo e prevenção da aterosclerose (CHEN e SEVIOUR, 2007; LAZARIDOU *et al.*, 2011), e imunomoduladora (BOHN e BeMILLER, 1995; BAO *et al.*, 2001).

Muitas glucanas também têm sido modificadas e/ou sintetizadas química ou enzimaticamente, por oxidação com periodato seguida de redução, esterificação entre outros, para serem utilizados como veículos para *drug delivery* (veículos de distribuição de fármacos em tecidos alvo), elicitores de defesa de plantas, antivirais e mais outras variadas funções (STONE, 2009).

Além de todos esses benefícios mencionados anteriormente, as β -glucanas também podem promover saúde pelo seu potencial efeito prebiótico, visto que podem ser fermentadas no cólon pela microbiota do intestino discutido no CAPÍTULO 3. Nas subsecções seguintes será discutida a atividade imunomoduladora de β -glucanas.

2.4.1 Atividade imunomoduladora

Polissacarídeos de diversas fontes podem ser capazes de modificar a resposta imunológica, sendo, portanto, denominados de modificadores da resposta biológica (BRM “biological response modifiers”). A estimulação do sistema imune envolve a ativação de macrófagos, diferenciação de células-T, resposta proliferativa de células polimorfonucleares, produção de interleucinas e interferon e o aumento da atividade fagocítica, entre outras respostas celulares (BOHN e BeMILLER, 1995).

Entre os polissacarídeos biologicamente ativos, as D-glucanas do tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6), extraídas de algumas espécies de fungos, revelaram-se compostos potentes, efetivos contra tumores e na terapia contra o câncer (SILVA *et al.*, 2006). É importante levar em consideração a estrutura fina que diferencia as β -glucanas, como o grau de ramificação, e o comprimento das cadeias laterais, fatores que influenciam diretamente na atividade biológica (BAO *et al.*, 2001). Além disso, o tipo das ligações glicosídicas entre as unidades de β -glucose interferem na

conformação tridimensional da molécula fazendo com que cadeias lineares de β -glucanas-(1 \rightarrow 3)-ligadas, por exemplo, assumam uma conformação terciária em tripla hélice importante para a atividade imunoestimuladora (CHUAH *et al.*, 1983; SLETMOEN e STOKKE, 2008; KANAGAWA *et al.*, 2011).

RIZZI (2010) destaca o aumento da atividade fagocítica de macrófagos quando tratados com baixas concentrações de β -D-glucanas extraídas das microalgas *I. galbana* e *T. fluviatilis*. No mesmo trabalho o tratamento com α -D-glucanas não aumentou a atividade fagocítica significativamente. As microalgas marinhas representam uma ampla fonte destas biomoléculas para realização de um “screening” para identificar novos compostos imunoestimulantes (STORSETH *et al.*, 2005).

2.4.2 Resposta imune intestinal

O intestino é o órgão responsável não só pela absorção de nutrientes, mas também pelo controle na invasão de patógenos. Por este motivo, vários mecanismos de proteção estão envolvidos, entre eles a barreira de muco e a secreção de proteínas antimicrobianas criam a primeira linha de defesa (VOLMAN *et al.*, 2010; LAPARRA e SANZ, 2010; QUIGLEY, 2010)

As células do sistema imune responsáveis pelo processo de defesa contra os patógenos são, principalmente, os enterócitos, linfócitos intestinais e células dendríticas (VOLMAN *et al.*, 2010; LICHT *et al.*, 2012). Com relação à resposta imune intestinal, existem vários exemplos de componentes da dieta que são capazes de afetar esse processo imunomodulatório. Dentre eles, um exemplo típico são as β -glucanas, que diferem na posição de suas ligações glicosídicas e perfil de substituições dependendo da fonte, e são consideradas modificadores da resposta biológica como discutido no item 2.4.1. Visto que tais moléculas são constituintes da parede celular de grão e cereais, e não são digeríveis, estas se encontram em contato direto com os enterócitos, e outras células da linha de defesa intestinal (VOLMAN *et al.*, 2010).

Em mamíferos, o receptor responsável pelo reconhecimento de β -glucanas e pelo consequente desencadeamento da resposta imunológica é a proteína dectina-1. Entretanto, estudos apontam que os efeitos imunomoduladores em enterócitos

não são mediados via dectina-1, pois esse receptor não é funcionalmente expresso nestas células. Especula-se que um receptor alternativo esteja envolvido nesta linhagem celular, ou ainda outras células como os macrófagos gastrointestinais. Contudo, ainda não está claro como estas células respondem a presença das β -glucanas no lúmen (VOLMAN *et al.*, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICROALGAS

Neste estudo foram utilizadas as microalgas marinhas *Pavlova lutheri* (Droop) e *Pavlova gyrams* (Butcher). A primeira foi proveniente da Coleção de Microalgas Elizabeth Aider, da Universidade Federal Fluminense (UFF) gentilmente cedida pelo prof. Sérgio Lourenço. A espécie *Pavlova gyrams* foi obtida da coleção de microalgas da Universidade do Texas sob o código LB 992.

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para o preparo do meio de cultura de manutenção das cepas, foi utilizada água marinha (salinidade ajustada para 30 g/L), filtrada através de filtros de celulose com porosidade 0,5 μ m e autoclavada (121 °C por 15 minutos). Para o meio de cultura utilizado no cultivo de microalgas, utilizou-se água destilada adicionada de sal marinho 30 g/L e posteriormente autoclavada.

A espécie *P. lutheri* foi cultivada em meio de cultura Guillard f/2 modificado (QUADRO 2).

QUADRO 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA SEMI-DEFINIDO GUILLARD F/2

Componentes	Volume
Água do Mar	1000 mL
Nitrato e fosfato (solução estoque ^a)	1,0 mL
Metais (solução estoque ^b)	1,0 mL
Vitaminas (solução estoque ^c)	1,0 mL
Solução de Tris (solução estoque ^d)	5,0 mL
*Silicato (solução estoque)	1,0 mL

NOTA: a) Solução de nitrato e fosfato: NaNO_3 : 75 g/L e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5 g/L; b) Solução de metais é constituída por 10 mL da solução estoque ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,20 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,63 g/L) adicionada de EDTA 5,5 g/L, $\text{ClFe}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,18 g/L; d) Solução de vitaminas: constituída por 2 mL/L da solução estoque (tiamina 50 g/L, biotina 0,5 g/L, cianocobalamina 0,5 g/L; e) Solução TRIS-HCl: 90 g de Tris, 60 mL de HCl em 850 mL de água destilada. A adição de Tris mantém o pH do meio de cultura entre 7,5-8,5.

*Somente necessário para o cultivo de diatomáceas, descartado no caso de microalgas do gênero *Pavlova*.

FONTE: Adaptado de LOURENÇO (2006).

A espécie *Pavlova gyrams* foi submetida ao crescimento em meio Guillard f/2 (QUADRO 2) e Erdschreiber (QUADRO 3) para otimização das condições de cultivo.

QUADRO 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA INDEFINIDO ERDSCHREIBER

Componentes	Volume
Água do Mar	1000 mL
Solução de Nitrato 0,7 M	3,3 mL
Solução de Fosfato 0,2 M	3,3 mL
Metais (solução estoque ^a)	12 mL
Vitaminas (solução estoque ^b)	1,0 mL
Extrato de solo ^c	50 mL

NOTA: a) Solução de metais: EDTA 0,75 g/L, $\text{ClFe}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,097 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,041 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,004 g/L; b) Solução de vitaminas: 200 mL de tampão Hepes 50 mM, cianocobalamina 0,135 g/L; e) Misturar 1 Kg de solo rico em 1L de água destilada, ferver por 30 min, após 3 dias em repouso, recolher e filtrar a fração líquida, esterilizar por autoclavagem. Meio modificado de Plymouth.

FONTE: Adaptado de LOURENÇO (2006).

As células foram cultivadas seguindo o sistema de cultivo microalgal do tipo batelada (item 2.2.2.1).

As cepas foram mantidas em sala climatizada a 18-20 °C, com iluminação constante. Seguindo procedimento habitual de esterilização do laboratório, as células foram repicadas em meio estéril para erlenmeyers de 250 mL. Após 7 dias foram transferidas a 1,5 L, onde receberam luz (fluorescente) e aeração constante.

Também, foi testado o cultivo destas microalgas em bombonas de 20 L. Para esterilização, a água foi submetida a um processo de desinfecção com hipoclorito de sódio (5 ppm), por 24 h, seguido de neutralização com tiosulfato de sódio (BECKER, 2008).

3.3 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Para determinação da curva de crescimento das microalgas *P. Lutheri* e *P. gyrams*, foram feitos experimentos independentes, em duplicata. Foi determinada a concentração inicial de células da cultura de cada uma das espécies em frascos erlenmeyers de 2 L e, durante o cultivo foi coletado 1 mL a cada 24 h. As alíquotas de 1 mL, foram aquecidas em banho fervente durante 5 minutos para inibir o metabolismo das células (visto que são móveis) sem prejuízo da morfologia celular.

As variações da concentração celular das microalgas, ao longo do desenvolvimento do cultivo, foram acompanhadas diariamente pela contagem de células em microscópio (aumento de 400x), com auxílio de uma câmara de Neubauer (*Improved Chamber*). A concentração celular foi expressa em número de células por mililitro de cultivo (células.mL⁻¹) de uma média de três contagens. Com os dados experimentais de concentração celular, foram elaboradas curvas de crescimento (concentração celular em função do tempo de cultivo).

O tempo de cultivo foi estabelecido correlacionando a curva de crescimento das microalgas e a determinação da concentração de carboidratos totais na biomassa, em diferentes pontos da curva de crescimento dos organismos.

Para avaliação da composição química da biomassa durante o crescimento foram preparados cultivos independentes, recolhidos nos dias 4, 8, 10, 12 e 14 de crescimento, os quais foram centrifugados a 10200 g durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e a biomassa precipitada cuidadosamente transferida para um recipiente previamente tarado e liofilizada. A biomassa seca foi submetida aos protocolos de análise descritos no item 5.

3.4 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS

O isolamento das células para obtenção da biomassa foi inicialmente realizado de duas formas, 1- por centrifugação (item 3.4.1) e 2- por floculação (item 3.4.2). Ao final de cada processo foi avaliada a composição química da biomassa das duas espécies *P. lutheri* e *P. gyrans*, com o objetivo de verificar possíveis alterações. Para os cultivos subseqüentes foram separados por centrifugação, o método escolhido baseou-se na praticidade para escala laboratorial. As biomassas recuperadas de *P. lutheri* e *P. gyrans* foram denominadas PL e PG respectivamente.

3.4.1 Centrifugação

As microalgas foram isoladas do meio de cultivo por meio de centrifugação a 10200 g. O sobrenadante foi descartado e a biomassa congelada e liofilizada. A biomassa liofilizada constituiu o material utilizado para as determinações seguintes. A biomassa foi determinada em miligramas de biomassa seca por litro de cultivo. A denominação das biomassas recuperadas por este método foi acrescida do sufixo C.

3.4.2 Floculação

Para provocar a floculação das células microalgais foi adicionado ao meio de cultivo 0,1 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,3 M) para cada 100 mL de meio (SOARES, 2010). A cultura com agente floculante permaneceu em repouso *overnight* para decantação das células. Os íons férricos são capazes de interagir com cargas negativas presentes na superfície das células, e formar agregados celulares que decantam (FIGURA 4). O sobrenadante límpido foi descartado e o volume contendo as células foi centrifugado como descrito no item 3.4.1. A biomassa precipitada foi congelada e liofilizada. A denominação das biomassas recuperadas por este método foi acrescida do sufixo F.

3.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA

3.5.1 Determinação de carboidratos totais

Para a dosagem de açúcares totais foi utilizada metodologia descrita por MYKLESTAD e HAUG (1972), adaptada para biomassa liofilizada. Entre 10 e 20 mg de biomassa foi tratada com 1 mL de H_2SO_4 a 80 % por 20 h (durante a adição do ácido e nas próximas 4 h subsequentes, os frascos contendo amostras foram mantidos em banho de gelo para evitar a carbonização das amostras) seguida de diluição com água destilada (9 mL) e dosagem. As dosagens de açúcares totais dos extratos foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) e foi utilizado como padrão glucose na concentração de 1 mg/mL.

3.5.2 Determinação de proteínas

Para proceder à dosagem de proteínas foi necessário obter um extrato alcalino a partir das microalgas liofilizadas, sendo que as condições de extrações variam para cada espécie de acordo, principalmente, com a composição da parede celular (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007). Para todas as espécies foram pesados 5 mg de amostra às quais foram adicionados 5 mL de NaOH 0.1 N. A extração alcalina de proteínas foi realizada a 80 °C em estufa por 10 min.

Na sequência, este extrato foi centrifugado a 3000 rpm por 15 min a 10 °C. As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de LOWRY *et al.*, (1951) utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu.

3.5.3 Determinação de lipídios totais

A extração e quantificação dos lipídeos totais da biomassa seca foram realizadas segundo método de BLIGH e DYER (1959) adaptado para microalgas (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007). Consiste na formação de uma mistura monofásica de clorofórmio e metanol ($CHCl_3:CH_3OH$) (2:1) com a qual se assegura a extração da maioria dos lipídeos, incluindo aqueles que se encontram ligados a outras moléculas. Agrega-se água ao extrato resultante de tal maneira que se forme uma

solução bifásica, formada por metanol e água na parte superior e clorofórmio na parte inferior.

Foram pesados entre 5 e 50 mg de biomassa liofilizada e transferidos para um tubo de vidro, aos quais foram adicionados 3 mL da mistura $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) e 50 μL de BHT (solução de 1 mg/mL solubilizado em CHCl_3). Na sequência, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de sonicação de 15 min em banho de água à temperatura ambiente. Os tubos foram incubados por 24 h a 4 °C protegidos da luz. Após incubação, as amostras foram novamente submetidas a 3 ciclos de sonicação de 15 min, e na sequência, centrifugadas a 5000 rpm por 20 min a 5 °C. O extrato (sobrenadante) foi separado e transferido para outro tubo. À biomassa residual foram adicionados 1,5 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1), a centrifugação foi repetida nas mesmas condições anteriores, e o extrato foi somado ao primeiro. No tubo contendo o extrato foram adicionados 2 mL de água destilada agitado em agitador de tubos. Na sequência, foi eliminado o excesso de água e centrifugado para separação da fase clorofórmica. A fase clorofórmica (lipídica) foi então transferida com pipeta Pasteur para um recipiente previamente pesado, e o solvente foi evaporado em atmosfera de N_2 , e quando completamente seco foi novamente pesado. A determinação de lipídios pelo método gravimétrico foi realizada pela diferença entre o peso dos tubos com e sem amostra e o percentual foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Lipídios} = \frac{100 \times (\text{peso do tubo com lipídios} - \text{peso do tubo vazio})}{\text{Peso da amostra (mg)}}$$

3.6 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA MICROALGAL

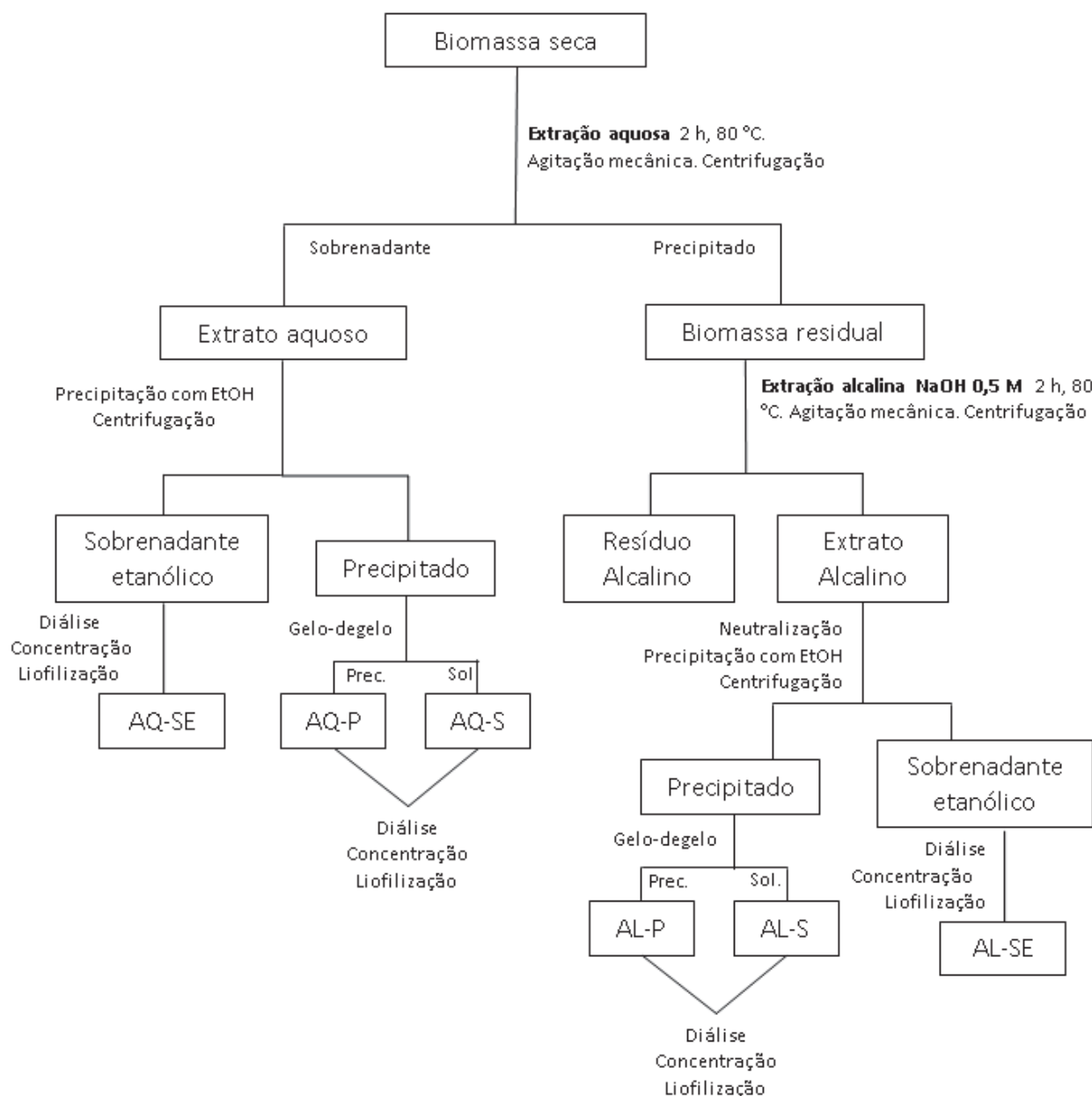
A extração aquosa sequencial da biomassa de ambas as espécies de microalgas foi realizada de acordo com o protocolo previamente estabelecido no nosso grupo de pesquisa (RIZZI, 2010) para uma espécie da mesma divisão *Isochrysis galbana* (FIGURA 6).

A biomassa liofilizada foi ressuspensa em água destilada (20 g/L) e submetida à extração aquosa por 2 h a 80 °C, sob agitação mecânica. Após o processo de extração o material foi centrifugado a 12000 g, por 20 min, a 4 °C, o

procedimento de extração aquosa foi repetido e os extratos agrupados. Na sequência, o extrato foi adicionado de 3 volumes de etanol. O precipitado, formado pela adição de etanol, foi isolado por centrifugação a 12000 g por 15 min a 4 °C, ressolubilizado em água, tratado por gelo-degelo, dialisado em membrana com limite de exclusão de 1 - 2 kDa e liofilizado para obtenção do extrato aquoso. O sobrenadante etanólico foi concentrado em rotaevaporador a temperatura entre 30 e 40 °C, dialisado em membrana de 1 kDa e liofilizado.

A biomassa residual da extração aquosa foi submetida à extração alcalina (20 g/L), com NaOH 0,5 M, após adição de NaBH₄ (5 % em relação a biomassa - com objetivo de impedir a degradação da molécula, na presença de base, a partir da ponta redutora) por 2 h a 80 °C, sob agitação mecânica. O extrato foi centrifugado (12000 g, por 20 min, a 4°C) e ao sobrenadante foram adicionados 3 volumes de etanol, novamente centrifugado. O precipitado obtido foi então ressolubilizado em água, dialisado (membrana de 12-14 kDa) e liofilizado para obtenção do extrato alcalino. O sobrenadante etanólico foi concentrado em rotaevaporador a temperatura entre 30 e 40 °C, dialisado em membrana de 12-14 kDa e liofilizado.

FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL



3.6.1 Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e degelo

As frações obtidas das extrações aquosas e alcalinas foram submetidas a este processo de fracionamento (FIGURA 6). As frações foram solubilizadas em água destilada, congeladas e, posteriormente, descongeladas à temperatura ambiente. O precipitado, insolúvel em água fria, foi separado por centrifugação a 12000 g por 20 min a 15 °C (GORIN e IACOMINI, 1984).

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.7.1 Métodos químicos

3.7.1.1 *Dosagem de açúcares totais*

A dosagem de açúcares totais dos polissacarídeos foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), sendo utilizado como padrão glucose na concentração 1 mg/mL e a leitura realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

3.7.1.2 *Dosagem de proteínas totais*

A dosagem de proteínas nas frações obtidas foi realizada de acordo com o método de LOWRY *et al.* (1951), sendo a solução de BSA (albumina sorobovina) utilizada como padrão na concentração de 1 mg/mL e a leitura realizada em espectrofotômetro a 660 nm.

3.7.1.3 *Hidrólise ácida total*

Para determinação da composição monossacarídica, os polissacarídeos foram submetidos à hidrólise ácida total. Aproximadamente 1,5 mg de polissacarídeo foram solubilizados em 0,5 mL TFA 2 M, e mantido em estufa a 100 °C por 2 h. Na sequência, o ácido foi eliminado e a amostra ressolubilizada em 0,5 mL de água destilada. Os monossacarídeos foram reduzidos com NaBH₄ por 12 h e neutralizados com ácido acético 50 % (v/v) até pH 5. O material seco foi submetido à co-destilação em metanol (3-4x). Os alditóis foram acetilados com 0,5 mL de anidrido acético por 1 h a 120 °C em estufa e os acetatos de alditóis produzidos foram extraídos com CHCl₃ do meio reacional, para posterior análise por CG-EM.

3.7.1.4 Metilação

O processo de metilação do polissacarídeo foi conduzido de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984). Após solubilização da amostra em DMSO (5 mg/mL), foi adicionado NaOH pulverizado (30 mg), sendo a mistura submetida a agitação magnética vigorosa por 30 min. Em seguida, foi adicionado iodeto de metila (0,2 mL), e mais 30 min sob agitação vigorosa. Este processo seqüencial de adição de NaOH e iodometano foi repetido por três vezes. Após interrupção da reação com água, a amostra foi neutralizada, com ácido acético 50 % (v/v), dialisada e liofilizada.

A hidrólise do polissacarídeo metilado foi realizada de acordo com as condições descritas para glucanas, por BAO *et al.* (2001). A amostra (1,5 mg) foi hidrolisada com ácido fórmico 90 % (0,5 mL), por 6 h a 100 °C e, em seguida, com TFA 2 M (0,5 mL) por 2 h a 80 °C, sendo posteriormente reduzida e acetilada (como descrito no item 3.7.1.3) para análise por CG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

3.7.2 Métodos cromatográficos e espectroscópicos

3.7.2.1 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

O método foi realizado em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3800, acoplado a um espectrômetro de massa da marca SATURN 200 R, modelo ITD 800. O CG equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 d.i.) modelo DB-225, marca J.W. O gás de arraste utilizado foi hélio, com fluxo de 1 mL/min. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetindo-se a cada 1/8 de segundo, e com intervalo de relação massa/carga (m/z) entre 90 a 220.

Este método foi utilizado para determinação da composição monossacarídica feita por meio da comparação entre os tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação da amostra, e os padrões - ribose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose. A quantificação de acetatos de alditóis

parcialmente metilados (SLONEKER, 1972) também seguiu esta metodologia, sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons comparado com padrões (JANSON *et al.*, 1976; SASSAKI *et al.*, 2005).

3.7.2.2 Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC-MALLS-RID)

As análises de homogeneidade dos extratos foram realizadas utilizando o cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração diferencial (RID) WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS). Para isto, foram preparadas soluções de 1 mg da amostra em 1 mL de nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) e azida de sódio (200 ppm) dissolvidas em água MilliQ, previamente filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) de 0,22 μm . A fase móvel utilizada foi nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) e azida de sódio (200 ppm). A análise foi realizada utilizando-se injeções de 500 μL de solução com fluxo de 0,6 mL/min. Os dados foram analisados através do programa ASTRA (WAYTT TECHNOLOGY).

3.7.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O equipamento utilizado para as análises de RMN foi da marca BRUKER, Modelo DRX 400, série Avance. Os espectros de RMN- ^{13}C , DEPT-135, ^1H e o bidimensional HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy) foram obtidos observando-se os núcleos de ^{13}C e ^1H a 100,61 e 400,13 MHz, respectivamente.

As amostras foram solubilizadas em DMSO, em concentrações entre 20 e 30 mg/mL para ^{13}C e 10 a 20 mg/mL para ^1H , foram analisadas em tubos de 5 mm a temperatura de 70 °C e tiveram seus deslocamentos químicos expressos em ppm.

A calibração dos espectros foi realizada utilizando a ressonância dos grupos CH_3 do DMSO, ^1H em 2,40 ppm e ^{13}C em 39,7 ppm.

3.8 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS

As curvas termogravimétricas foram obtidas utilizando o equipamento STA 449 F3 Jupiter em intervalo compreendido entre 21 e 800 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/ min, sob atmosfera inerte de nitrogênio. A análise termogravimétrica (TGA) foi utilizada para avaliação da perda de massa dos compostos presentes na biomassa das microalgas *P. gyrans* e *P. lutheri* assim como de seus extratos, com o aumento de temperatura. Além de ser um método alternativo na determinação de umidade e cinzas (material resistente a degradação térmica acima de 600 °C). Para confirmação dos eventos de degradação térmica foi analisada a termogravimetria derivada (DTG), ou seja, a taxa de variação da massa em função da temperatura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

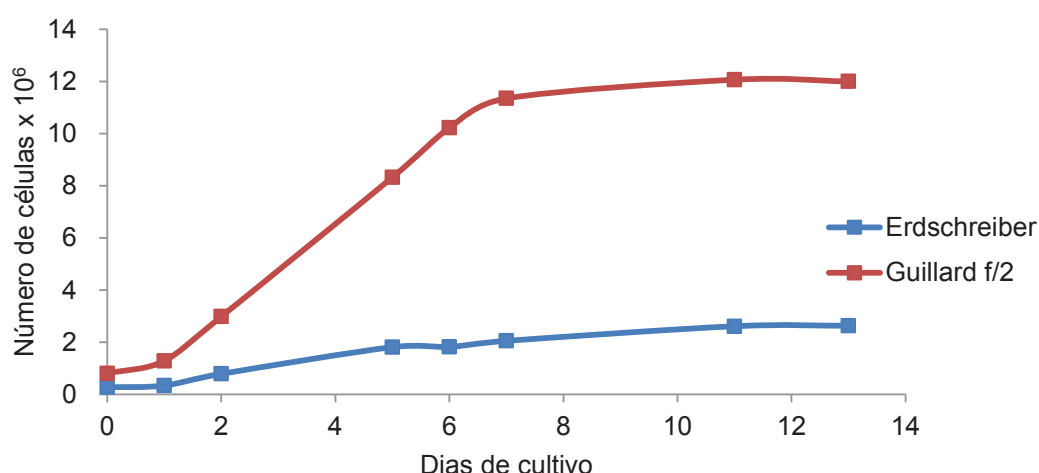
Inicialmente serão apresentados os resultados obtidos na avaliação da cinética de crescimento das microalgas e determinação do tempo de cultivo, assim como a determinação da composição química da biomassa das duas espécies estudadas, comparando-se os diferentes processos de recuperação da biomassa - centrifugação e floculação. Na sequência são apresentados os resultados obtidos para a extração dos polissacarídeos e a determinação da estrutura química.

4.1 ANÁLISE DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS ESPÉCIES *P. gyrans* e *P. lutheri*

A microalga marinha *P. gyrans*, obtida do laboratório da Universidade do Texas (UTEX, USA), foi recebida no meio de cultura Erdschreiber, meio no qual era mantida até então. Na fase de estabelecimento do cultivo desta espécie em nosso laboratório, foi verificada a curva de crescimento, tanto no meio Erdschreiber ao qual a cepa já estava adaptada, quanto no meio Guillard f/2, meio usual para o cultivo da espécie marinha *P. lutheri*. Na FIGURA 7 é possível comparar as curvas de crescimento nos dois meios. Observa-se que o meio Erdschreiber propiciou

crescimento lento e discreto no número de células durante todo o período de cultivo, sendo quase imperceptível a distinção entre as fases lag, log e estacionária, quando comparada ao cultivo realizado no meio Guillard f/2. Visto isso, acredita-se que possivelmente o meio Erdschreiber seja utilizado para manutenção das cepas por possibilitar um crescimento mais lento. O meio Guillard f/2 mostrou-se um meio mais propício para a obtenção de maior quantidade de biomassa desta espécie, apresentando concentração celular 6 vezes maior. Este resultado foi decisivo na determinação do meio Guillard f/2 como meio padrão para o cultivo da microalga *P. gyrams*.

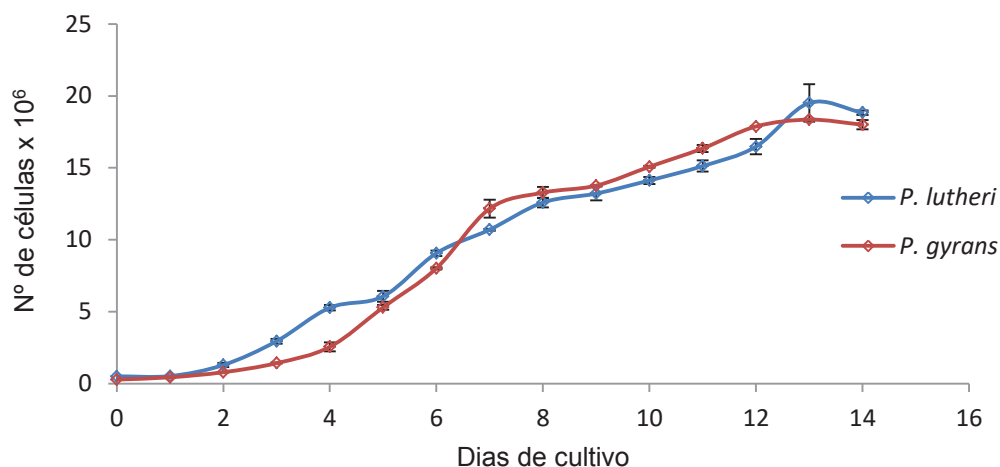
FIGURA 7 - CURVAS DE CRESCIMENTO DE *Pavlova gyrams* EM MEIO ERDSCHREIBER E GUILLARD F/2



Com relação à curva de crescimento da espécie *P. lutheri* (FIGURA 8A) observa-se que os primeiros dois dias constituem a fase adaptativa das células ao meio de cultivo. Do 2º ao 6º dia, as células encontram-se na fase exponencial e a partir daí a densidade celular é praticamente estável.

O crescimento da microalga *P. gyrams* em meio Guillard f/2 (FIGURA 8B) apresentou um tempo maior dedicado a fase adaptativa, cerca de 4 dias, a fase exponencial, embora tenha terminado no 6º dia de cultivo (bem próximo ao observado para microalga *P. lutheri*) foi mais curta. No período de 3 dias o número de células aumentou aproximadamente 4 vezes. A partir do 6º dia observa-se ainda um crescimento discreto que consolida a fase estacionária a partir 8º dia de cultivo.

Ambas as espécies apresentaram alta concentração celular ao final dos 14 dias de cultivo, entre 18 a 20 x 10⁶ células.mL⁻¹.

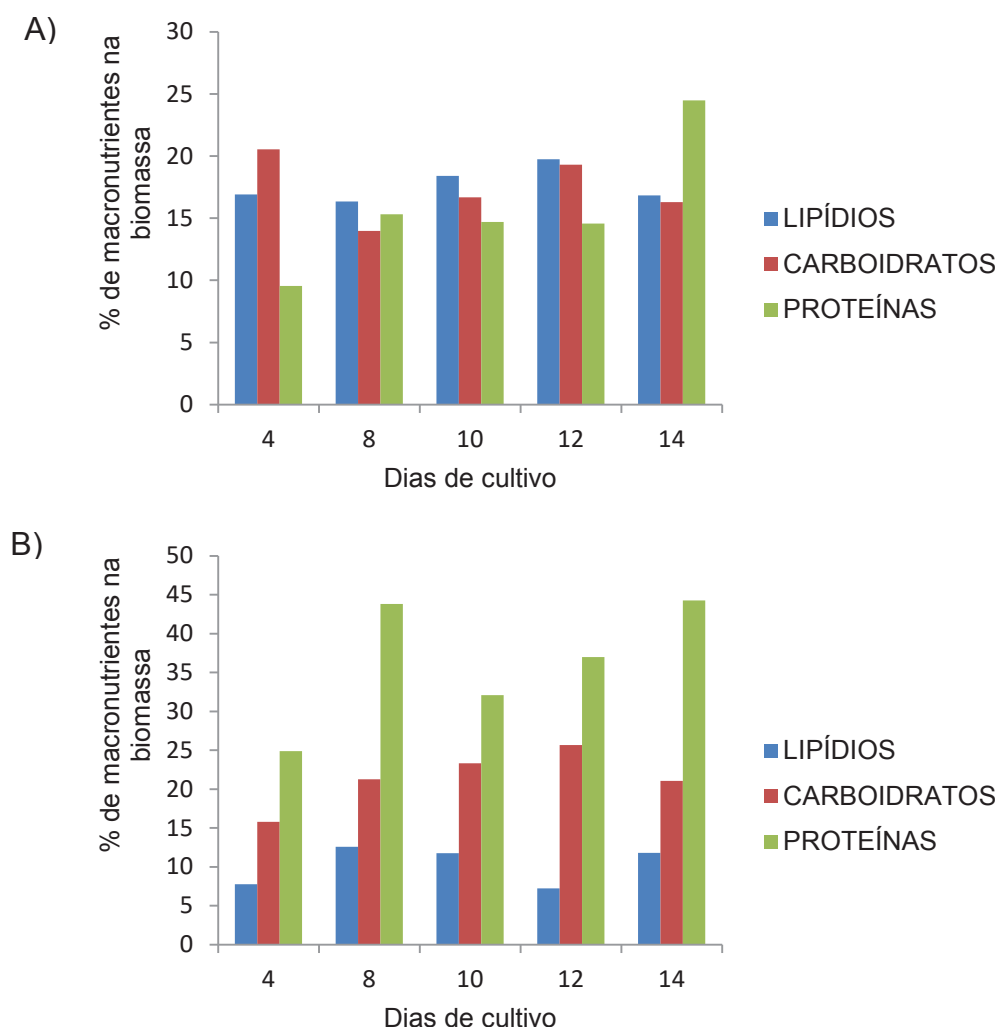
FIGURA 8 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *Pavlova lutheri* E *P. gyrans* EM MEIO GUILLARD F/2

De acordo com LOURENÇO (2006), no início do cultivo, devido às condições propícias para o desenvolvimento da cultura, as células apresentam-se morfolologicamente saudáveis, distribuem-se de forma homogênea na cultura e dividem-se rapidamente. As espécies móveis apresentam nesta fase movimentos vigorosos. Com o avanço do cultivo, às células tendem a acumular-se no fundo do frasco, há maior número de deformações e/ou de diferentes tamanhos celulares, ciclos mais lentos, entre outros. Esse mesmo comportamento pode ser observado nos cultivos de ambas as espécies utilizadas neste trabalho.

Todas as alterações fisiológicas observadas nas células geralmente vêm acompanhadas de mudanças na composição química da biomassa (LOURENÇO, 2006). A fim de verificar quais alterações bioquímicas estão ocorrendo ao longo do cultivo das microalgas, foram determinados os teores de carboidratos, lipídios e proteínas em biomassas obtidas nos dias 4, 8, 10, 12 e 14 de cultivo (FIGURA 9).

A determinação do tempo ideal de cultivo foi realizada com base na análise da curva de crescimento e na composição bioquímica da biomassa ao longo do cultivo, sendo priorizado o máximo teor de carboidratos na biomassa.

FIGURA 9 - TEOR DE MACRONUTRIENTES NA BIOMASSA DE *P. lutheri* (A) E *P. gyrans* (B) DURANTE O CULTIVO



Na microalga *P. lutheri*, observa-se que o teor de lipídios, variou de 16,3 a 19,7 % ao longo do cultivo, apresentando pouca variação. O teor de proteínas foi crescente, variando de 9,5 a 14,7 % e apresentando apenas no final do cultivo (14º dia) um aumento considerável atingindo 24,5 % (FIGURA 9A). O percentual de carboídratos também não apresentou grandes variações, mantendo-se próximo a 20% desde a fase de adaptação até a fase estacionária.

Nas análises realizadas com a biomassa de *P. gyrans* (FIGURA 9B) é possível observar que o teor de lipídios apresenta um discreto aumento, até o 10º dia de cultivo, atingindo 12,6 %, declinando no 12º dia. Possivelmente essa diminuição ocorre devido ao consumo dos lipídios como fonte de energia e devido a limitação de nutrientes ao final da fase exponencial. Esse teor volta a aumentar na fase estacionária, o que segundo LOURENÇO (2006), ocorre com os nutrientes

estocados como fonte de energia pelas células, em culturas mais velhas, em decorrência do detrimento de nitrogênio. Essa espécie apresentou elevado teor de proteínas, tendo seu ápice (44,3 %) durante a fase exponencial. De acordo com LOURENÇO (2006), a alta disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo favorece o acúmulo de proteínas nesta fase. O percentual de carboidratos aumentou progressivamente durante o desenvolvimento do cultivo, alcançando 25,7 %. Não foram encontrados até então na literatura dados sobre a composição química de *P. gyrans*.

BROWN *et al.* (1991) determinaram o teor de carboidratos, proteínas e lipídios na biomassa de *P. lutheri* cultivada até o fim da fase exponencial em meio Guillard f/2, e encontraram 12 % lipídios, 9 % de carboidratos e 29 % de proteínas. Embora a metodologia empregada para determinação do conteúdo de macronutrientes na biomassa não tenha sido a mesma deste trabalho, os valores, principalmente de lipídios e proteínas, são próximos. Neste trabalho na fase exponencial (14º dia de cultivo) foram encontrados 16,8 % de lipídios, e 24,5 % de proteínas (TABELA 1). O teor de carboidratos (16,3 %) foi praticamente o dobro do valor observado por BROWN *et al.* (1991).

A biomassa de *P. gyrans* na fase exponencial apresentou um conteúdo ainda maior de carboidratos (21,1 %), quando comparado a *P. lutheri*. Embora tenha apresentado também um teor cerca de duas vezes maior de proteínas 44,3 %. O conteúdo de lipídios ao longo de todo o desenvolvimento do cultivo foi mais baixo, variando de 7 a 12 % (TABELA 1).

Com base na avaliação da composição química da biomassa das microalgas e na avaliação do rendimento, estipulou-se, então, o tempo de 14 dias para o cultivo de ambas as microalgas.

Para a extração dos lipídios e carboidratos, BROWN *et al.* (1991) utilizaram uma mistura de clorofórmio, metanol e água (2:4:1), repetindo-se o processo até o extrato ficar incolor. Este método provê três frações: uma clorofórmica, rica em lipídios; uma fração rica em mono e oligossacarídeos (metanol/água) e um resíduo contendo os polissacarídeos (posteriormente extraídos com H₂SO₄ 0,5 M a 100 °C por 4 h). O teor de carboidratos tanto na fração metanol/água quanto no resíduo hidrolisado, foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico, e somados ao teor de carboidratos totais na biomassa. Para determinação de proteínas e aminoácidos a

biomassa foi submetida à hidrólise com ácido metanossulfônico. Depois de identificados e quantificados, a quantidade de cada aminoácido foi somada para uma estimativa do teor de proteínas.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE *Pavlova lutheri* (PL) E *P. gyrams* (PG)

	Dia de Cultivo	Lipídios (%)	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Total
<i>P. lutheri</i>	4	16,9	20,5	9,5	47,0
	8	16,3	14,0	15,3	45,6
	10	18,4	16,7	14,7	49,8
	12	19,7	19,3	14,6	53,6
	14	16,8	16,3	24,5	57,6
<i>P. gyrams</i>	4	7,8	15,8	24,9	48,5
	8	12,6	21,3	43,8	77,7
	10	11,8	23,3	32,1	67,2
	12	7,2	25,7	37,0	69,9
	14	11,8	21,1	44,3	77,1

O teor de carboidratos foi a principal diferença observada na composição química da biomassa de espécies do gênero *Pavlova* descritas na literatura (aproximadamente 10 %, BROWN *et al.*, 1991) e as espécies estudadas neste trabalho (cerca de 20 %, TABELA 1).

O teor de cinzas não foi determinado, entretanto sabe-se que em microalgas, devido ao alto acúmulo de minerais, o teor de cinzas pode ser elevado, variando de 6 até 40 % dependendo da espécie em questão (RENAUD *et al.*, 1999; BROWN, 1991; BROWN *et al.* (1989 citado por LOURENCO, 2006)).

4.2 ANÁLISE DOS DIFERENTES PROCESSOS DE SEPARAÇÃO DA BIOMASSA E SUA INFLUÊNCIA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA

Ao final do 14º dia de cultivo, as culturas das duas espécies estudadas foram submetidas a diferentes processos para separação da biomassa sendo eles centrifugação (C) e floculação (F). Na TABELA 2 encontram-se os dados de

rendimentos de biomassa seca por litro de cultivo para os dois processos em ambas as microalgas.

Observou-se que para ambas as espécies o rendimento foi menor que 1 g/L, independente do processo utilizado. Não foi observado um padrão de rendimento para os dois procedimentos utilizados, sendo que o rendimento de biomassa de *P. gyrans*, quando separada por centrifugação, foi menor e de *P. lutheri* maior.

TABELA 2 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE *P. gyrans* (PG) E *P. lutheri* (PL), COMPARANDO-SE OS DIFERENTES PROCESSOS DE SEPARAÇÃO, CENTRIFUGAÇÃO (C) E FLOCULAÇÃO (F)

Espécie	Concentração (g/L)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)	Proteínas (%)
PL-C	0,70	36,1	13,6	26,1
PL-F	0,65	38,9	27,2	20,0
PG-C	0,41	33,1	38,8	19,3
PG-F	0,51	20,9	37,0	19,6

As biomassas de *P. gyrans* e *P. lutheri* obtidas por centrifugação e floculação foram submetidas à determinação de carboidratos totais, proteínas e lipídios, para avaliar o efeito dos tratamentos de recuperação da biomassa na composição química da biomassa (TABELA 2).

A análise da composição química da biomassa também teve como objetivo verificar se o processo de floculação promoveria alguma alteração no teor de macronutrientes. A proximidade dos valores pode apresentar um indicativo de que o processo de separação não interfere na composição química da biomassa.

Esses experimentos foram inicialmente conduzidos com objetivo de aumentar a escala de cultivo com frascos erlenmeyer para galões de 20 L e avaliar se o perfil de macronutrientes manteria-se inalterado apesar do uso de flocculante. Entretanto, as dificuldades experimentais no manejo dos galões já no primeiro experimento nos levaram a manter o cultivo apenas em erlenmeyers de até 2 L. Por esse motivo, não existem mais dados conclusivos para avaliação dos processos na qualidade da biomassa.

4.3 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS DE *Pavlova gyrams*

4.3.1 Extração e caracterização química dos polissacarídeos

Todos os rendimentos correspondentes às frações derivadas da extração aquosa e alcalina estão representados na TABELA 3 (percentual em relação à biomassa seca). As frações aquosas tiveram rendimento variável entre 0,8 e 3,8 %, enquanto para as frações alcalinas os rendimentos variaram entre 0,4 e 5,8 %.

Os extratos aquosos e alcalinos foram submetidos ao fracionamento denominado gelo-degelo (neste tratamento os polissacarídeos foram fracionados de acordo com a solubilidade diferencial em água fria). As frações foram adicionadas do sufixo P e S quando precipitadas ou solúveis por esse tratamento, respectivamente. Estas frações foram submetidas a análises químicas e de composição monossacarídica (TABELA 3).

TABELA 3 - ANÁLISE QUÍMICA E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (mol %) DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA *Pavlova gyrams*

Amostra	Rend.	Cho ^a	Ptn ^b	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Extratos aquosos										
PGAQ-P	0,9	83,5	10,7	tr ^c	tr ^c	tr ^c	tr ^c	tr ^c	tr ^c	96,6
PGAQ-S	3,8	68,6	18,1	2,0	7,0	tr ^c	tr ^c	2,0	3,4	83,6
PGAQ-SE	0,8	42,1	12,8	nd	nd	nd	nd	2,8	2,8	94,4
Extratos alcalinos										
PGAL-P	1,2	11,6	30,0	5,2	6,5	3,7	10,6	21,6	16,0	36,3
PGAL-S	0,4	15,3	38,4	4,1	6,6	9,0	11,2	12,2	24,2	32,5
PGAL-SE	5,8	4,3	56,5	3,9	8,5	5,9	3,6	19,3	16,2	42,5

NOTA: ^a: Carboidratos (%); ^b: Proteínas (%); ^c: traço ≤ 1 mol%; nd: não detectado. Rha corresponde a ramnose, Fuc a fucose, Ara a arabinose, Xyl a xilose, Man a manose, Gal a galactose, Glc a glucose.

Estes resultados indicam que os carboidratos concentram-se nas frações aquosas dos extratos da microalga *P. gyrams*, variando de 42,1 a 83,5 %, enquanto nas frações alcalinas o teor máximo de carboidrato foi 15,3 %. Além disso, todas as frações apresentaram elevado teor de proteínas variando de 10,7 a 56,5 %. Este resultado também era esperado visto alto teor de proteínas quantificado na biomassa microalgal. As proteínas concentraram-se mais nos extratos alcalinos.

As frações também foram analisadas quanto a sua composição monossacarídica (TABELA 3). Analisando os resultados é possível observar que as frações com baixo teor de carboidratos (PGAL-P, PGAL-S e PGAL-SE) apresentaram uma composição heterogênea de monossacarídeos, sendo que até 80% da composição está representada por xilose, manose, galactose e glucose, este último em maior proporção variando de 32,5 a 42,5 %. As frações aquosas, por sua vez, são majoritariamente compostas por glucose, apresentando até 96 % deste açúcar em sua composição, o que indica a presença de glucanas.

As frações derivadas do extrato aquoso da microalga *P. gyrans*, PGAQ-P e PGAQ-S, mostraram baixa solubilidade em água nas concentrações necessárias para análise de RMN. Por esta razão as mesmas foram submetidas a tratamento por solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO). Nesse tratamento as amostras foram mantidas em DMSO sob agitação magnética a temperatura ambiente *overnight* e, posteriormente, centrifugadas. O material solúvel (sobrenadante) foi dialisado e o precipitado foi descartado. A análise química indicou que a solubilização com DMSO promoveu uma purificação das frações visto o aumento no teor de carboidratos e a praticamente eliminação das proteínas (TABELA 4).

TABELA 4 - ANÁLISE QUÍMICA E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES TRATADAS COM DMSO DA MICROALGA *Pavlova gyrans*

Amostra	Cho ^a	Ptn ^b	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
PGAQ-P	94,5	nd	tr ^c	tr ^c	tr ^c	tr ^c	tr ^c	97,0
PGAQ-S	66,8	nd	3,5	4,7	6,3	2,0	tr ^c	82,5

NOTA: ^a: Carboidratos; ^b: Proteínas; ^c: traço ≤ 1 mol %; nd: não detectado. Rib corresponde a ribose, Fuc a fucose, Ara a arabinose, Xyl a xilose, Man a manose, Gal a galactose, Glc a glucose.

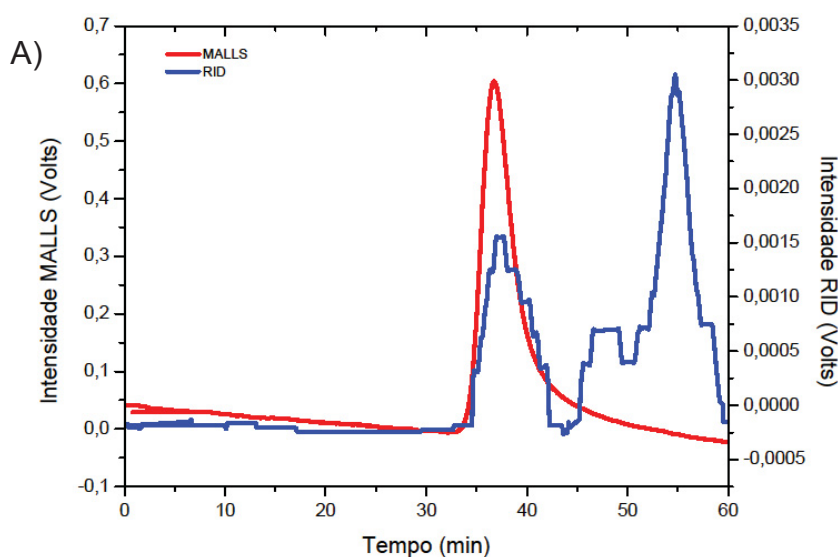
Para determinação da homogeneidade as frações foram submetidas à análise de HPSEC como mostrado a seguir.

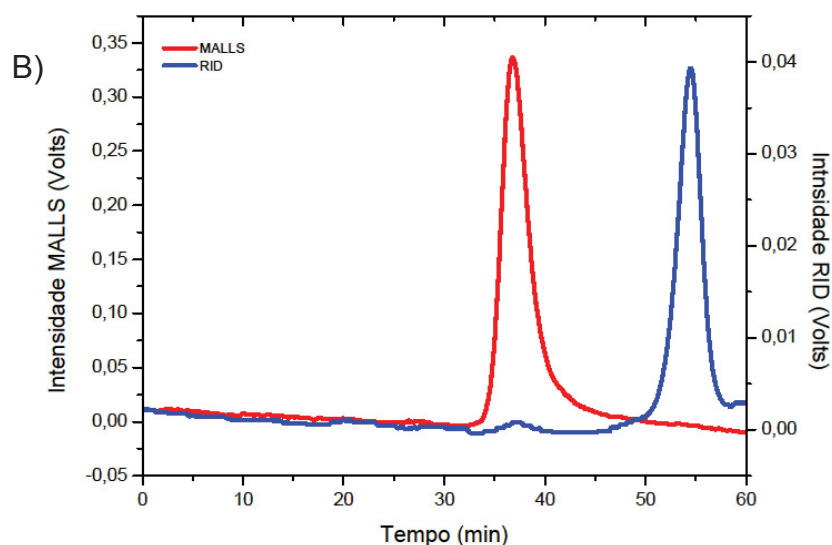
4.3.2 Análises de homogeneidade por HPSEC-MALLS-RID

A análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS (FIGURA 10), realizada com as frações aquosas PGAQ-P e PGAQ-S, mostrou perfil muito similar (FIGURA 10 A e B). Ambas as frações apresentaram um único pico entre 35 e 40 min detectado pelo espalhamento de luz (MALLS). Já o detector de Índice de Refração (RID) indicou dois picos principais, sendo um deles coincidente com o pico do MALLS entre 35 e 40 min e outro próximo a 55 min. O detector de espalhamento de luz detecta a presença de moléculas de alta massa molar, assim, quanto menor o tempo de eluição, de maneira geral, maior massa do polímero. O detector de índice de refração é um indicador da concentração das moléculas em solução, onde quanto mais intensos os picos, de maneira geral, maior a quantidade do polímero na amostra.

A principal diferença observada na análise de homogeneidade dessas frações é a intensidade dos picos detectados pelo RID. Na fração PGAQ-P (FIGURA 10 A) é possível observar que ambos os picos apresentaram alta intensidade, indicando a presença de dois polímeros um de alta massa molar (pico ~ 35 e 40 min), que está presente na fração em alta concentração, além de outro polímero de menor massa (pico ~55 min).

FIGURA 10 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES PGAQ-P (A) E PGAQ-S (B)





Na fração PGAQ-S apenas uma concentração muito pequena do polímero de maior massa molar (pico ~ 35 e 40 min) foi detectada pelo RID, sendo representada por um ombro nessa mesma faixa de tempo. Já, o polímero de menor massa molecular foi detectado em alta quantidade pelo RID (pico ~55 min) e não detectado pelo espalhamento de luz.

Esse resultado indica que as frações não são totalmente homogêneas quanto a massa molecular do polímero em solução, indicando um polímero de massas moleculares distintas. O perfil de eluição indica que tanto PGAQ-P quanto PGAQ-S são compostas pelos mesmos polímeros, entretanto em proporções distintas.

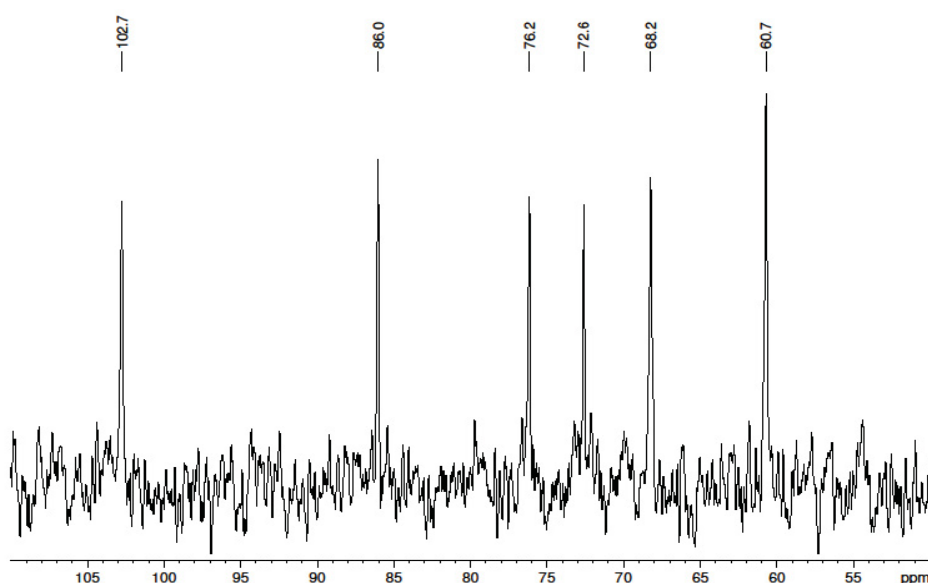
Para auxílio na determinação da estrutura química destes polissacarídeos, as amostras foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear.

4.3.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das frações obtidas da microalga *P. gyrams*

Na análise de RMN da fração aquosa PGAQ-P (FIGURA 11) foram verificados seis sinais principais na região de carboidratos (entre 60 e 110 ppm), referentes aos seis carbonos do anel de glucose (componente majoritário desta fração). São eles: 102,7 ppm referente ao carbono anomérico (C-1) em anomericidade β , em 72,6 o sinal referente ao C-2, em 86,0 o sinal do C-3 ligado,

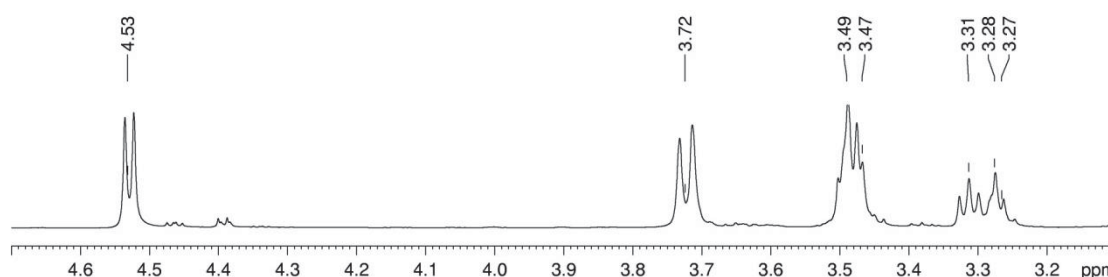
em 68,2 e 76,2 ppm sinais referentes ao C-4 e C-5, respectivamente. Esses sinais indicam a presença de β -glucanas-(1 \rightarrow 3)-ligadas.

FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PGAQ-P



NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

A fração PGAQ-P também foi analisada por RMN de ^1H (FIGURA 12). Essa análise mostrou sinal em 4,53 ppm referente ao H-1, com constante de acoplamento de 7,72 Hz. Esse valor alto (em relação aos deslocamentos padrão para hidrogênios em ligação α) para constante de acoplamento desse duplete confirma a anomericidade em β . O sinal 3,31 ppm é referente ao H-2, em 3,49 ppm sinal correspondente ao H-3 ligado, em 3,27 e 3,28 os sinais de H-4 e H-5 respectivamente. Além disso, ainda é possível observar em 3,72 e 3,46 os sinais correspondentes aos dois hidrogênios ligados ao C-6 livre (H-6 e H-6'), único carbono do tipo CH_2 .

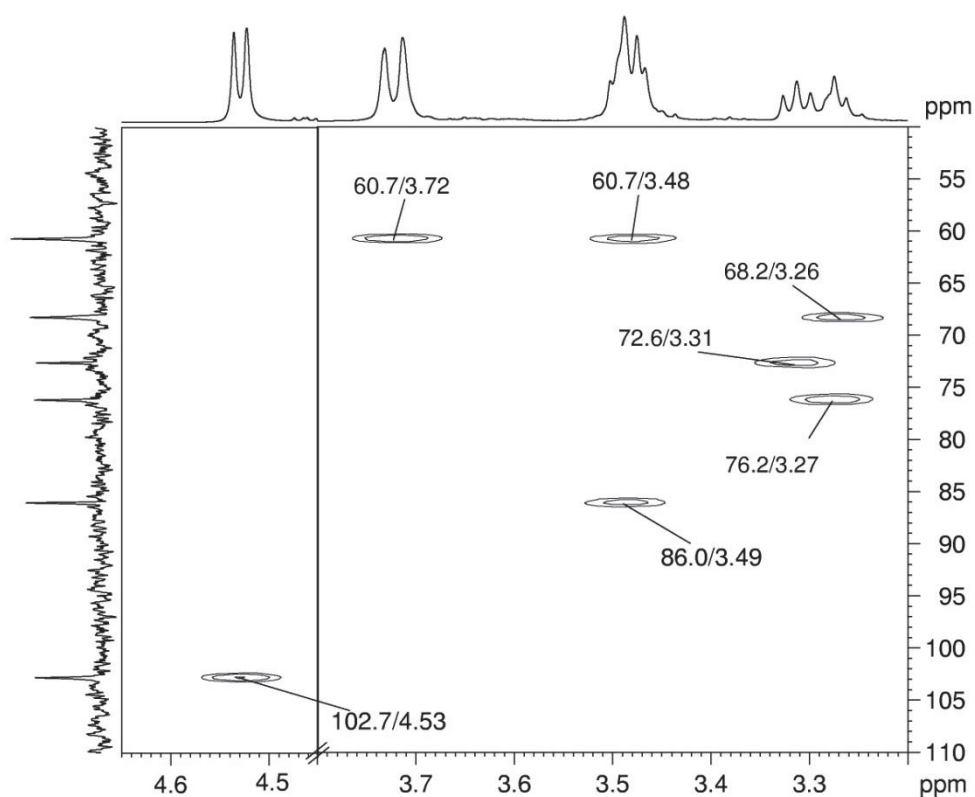
FIGURA 12 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PGAQ-P

NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

A partir do experimento de HSQC (FIGURA 13), foi possível confirmar o assinalamento de todos os sinais do experimento de ^1H da fração PGAQ-P. No espectro de ^1H é possível observar um sinal muito próximo ao ruído em aproximadamente 4,39 ppm; entretanto, não foi possível observar nenhuma correlação referente a este sinal no espectro de HSQC.

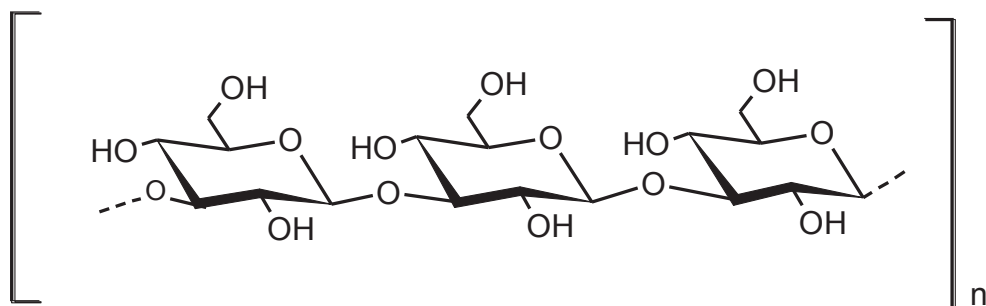
Os assinalamentos realizados estão de acordo com os descritos por GORIN (1981) e também reportados para β -glucanas (1 \rightarrow 3)-ligadas extraídas do microbionte isolado do líquen *Teloschistes flavicans* (RUTHES *et al.*, 2008) rica em β -glucanas lineares (1 \rightarrow 3)-ligadas. De acordo com RUTHES *et al.* (2008), o sinal em 102,9 ppm corresponde ao C-1, e os demais em 72,8, 86,1, 68,4, 76,3 e 60,9 ppm ao C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 livre, respectivamente. Esses sinais são muito semelhantes aos observados neste estudo, com variação de apenas 0,1 a 0,2 ppm, possivelmente devido a utilização de solventes e temperaturas diferentes para análise. Esses sinais também foram atribuídos a β -glucana linear isolada do fungo *Pleurotus sajor-caju* (SILVEIRA *et al.*, 2014) e na fração obtida a partir do fungo *Pleurotus enrygii*, após submissão a degradação de Smith (CARBONERO *et al.*, 2006). Portanto, conclui-se que a fração aquosa obtida da microalga *P.gyrans* e precipitada em tratamento de gelo-degelo é composta por uma β -D-glucana-(1 \rightarrow 3)-linear (FIGURA 14).

FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PGAQ-P



NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

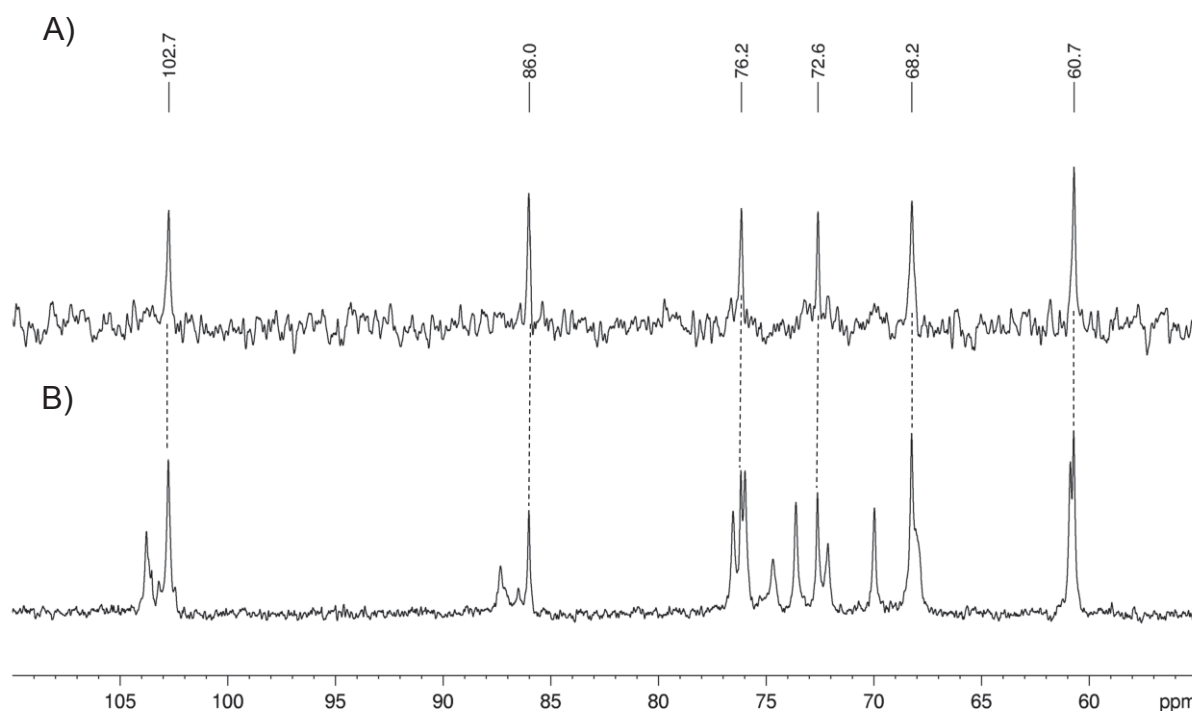
FIGURA 14 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA O POLISSACARÍDEO DA FRAÇÃO PGAQ-P



A análise de RMN de ^{13}C da fração PGAQ-S (FIGURA 15) mostra um espectro mais complexo, se comparado à fração discutida anteriormente. Foram observados os mesmos seis sinais existentes na fração precipitada referentes à β -glucana linear. Entretanto, outros sinais também são bem evidentes como em 103,8 ppm, que indica a presença de carbono anomérico em diferente ambiente químico, em 87,3 e 86,5 ppm na região de C-3 ligado e em 60,9 ppm na região de C-6 livre.

Além disso, é observada grande complexidade de sinais na região do anel, o que indica a presença de ramificações na cadeia principal.

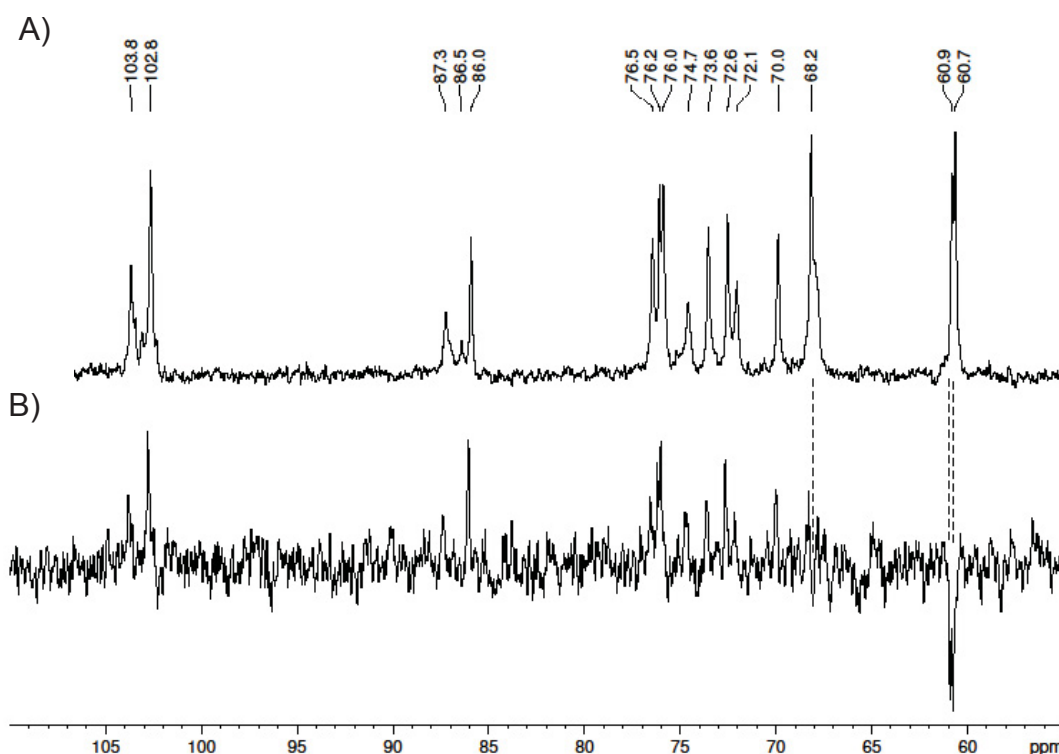
FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PGAQ-P (A) E PGAQ-S (B)



NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

Essa fração foi então submetida a análise de RMN de DEPT, uma técnica que permite a inversão dos sinais de carbonos do tipo CH_2 . Tratando-se de polissacarídeos, os carbonos susceptíveis a inversão são os C-5 e C-6 de pentoses hexoses, respectivamente.

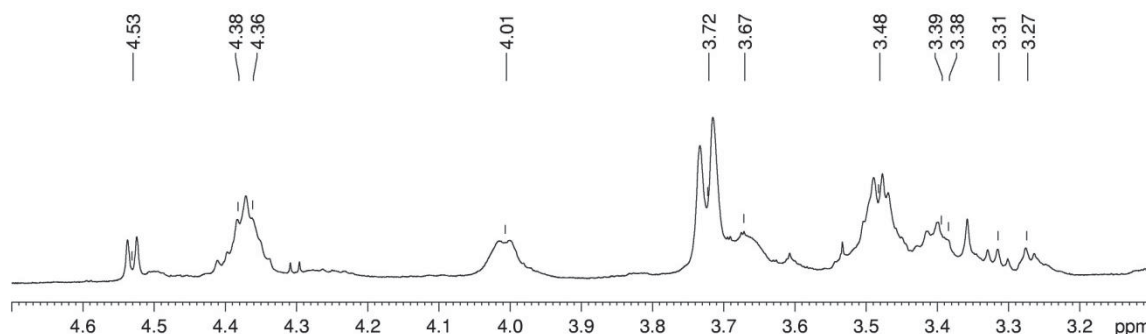
Na FIGURA 16 A é possível observar o assinalamento de todos os carbonos da molécula presente na fração PGAQ-S. As inversões de sinais (FIGURA 16 B) foram indicadas pelas linhas pontilhadas.

FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PGAQ-S (A) E DEPT 135 (B)

NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

Pelo menos dois sinais aparecem claramente invertidos no experimento de DEPT em 60,7 e 60,9 ppm. Esses sinais correspondem aos C-6 livres nessa molécula. No pico em 68,2 ppm, observa-se um ombro próximo a 68,0 ppm que parece também estar invertido, embora na linha de ruídos, devido a sua intensidade, tornando difícil diferenciá-lo.

O experimento de RMN de ^1H (FIGURA 17) verifica-se alguns dos sinais referentes à presença da β -glucana linear, entretanto outros sinais de alta intensidade são assinalados como em 4,36, 4,38 e 4,01. Para elucidação da estrutura química essa fração foi submetida ao experimento de HSQC.

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PGAQ-S

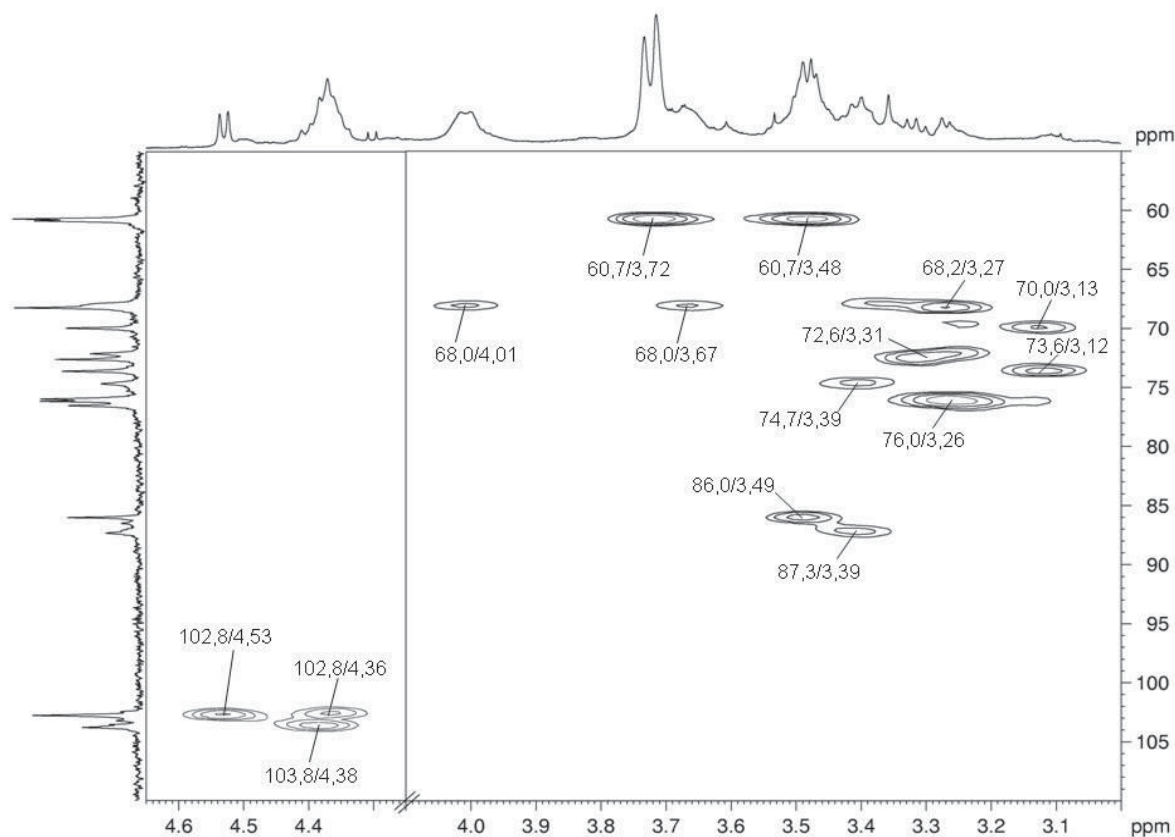
NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

A partir do espectro de HSQC da fração PGAQ-S (FIGURA 18) foi possível estabelecer o assinalamento de todos os sinais (TABELA 6). Na região de carbonos anoméricos foi observada a mesma correlação da fração discutida anteriormente (constituída pela β -glucana linear), em 102,8/4,53 ppm correspondente ao C-1/H-1 de unidades de glucose β -(1 \rightarrow 3)-ligadas, além de outras duas correlações em 103,8/4,36 ppm referente ao C-1/H-1 de unidades de glucose O-3-ligadas e O-6-substituídas e em 103,8/4,38 ppm referente ao C-1/H-1 de unidades de terminais não redutores (TNR) de glucose. Na região de C-3/H-3 ligado é possível observar duas correlações em 86,0/3,49 e 87,3/3,39 ppm de unidades de glucose β -(1 \rightarrow 3)-ligadas e unidades de glucose di-substituídas (em O-3 e O-6), respectivamente. Na região de C-6/H-6 livre, embora dois picos possam ser observados no espectro de ^{13}C em 60,7 e 60,9 ppm, apenas as correlações referentes ao C-6/H-6;H-6' de unidades de glucose β -(1 \rightarrow 3)-ligadas foram observadas em 60,7/3,72;3,48 ppm, possivelmente se sobrepondo ao pico em 60,9 ppm referente C-6/H-6;H-6' de TNR de glucose. Para o sinal em 68,0 ppm foram observadas duas correlações em 4,01 e 3,67 (C-6/H-6;H-6') confirmando então que este é um C-6 substituído devido ao deslocamento do sinal para campo baixo. Com relação aos demais carbonos do anel, foram observadas correlações em 72,6/3,31 (C-2/H-2), 68,2/3,27 (C-4/H-4) e 76,0/3,26 (C-5/H-5), correspondentes a unidade de glucose β -(1 \rightarrow 3)-ligadas. Em 74,7/3,39 ppm encontra-se a correlação referente ao C-5/H-5 da unidade de glucose di-substituída. Em 73,6/3,12 (C-2/H-2) e 70,0/3,13 ppm (C-4/H-4) de TNR de glucose. Os sinais em 76,5 (C-3) e 76,2 ppm (C-5) também estão relacionados ao

TNR de glucose, entretanto não foi possível determinar sua correlação exata devido a sobreposição com a correlação em 76,0/3,26 ppm.

Os assinalamentos realizados estão de acordo com os estabelecidos na identificação de β -glucanas fúngicas isoladas de *Lactarius rufus* (RUTHES *et al.*, 2013), *P. sajor-caju* (CARBONERO *et al.*, 2012), *Ganoderma Resinaceum* (AMARAL *et al.*, 2008), *Ganoderma lucidum* (BAO *et al.*, 2001), *Pleurotus tuber-regium* (CHENGHUA *et al.*, 2000), *Pleurotus ostreatoroseus* e *P. enrygii* (CARBONERO *et al.*, 2006) e do micobionte ascomiceto isolado do líquen *T. flavicans* (RUTHES *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2002).

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PGAQ-S

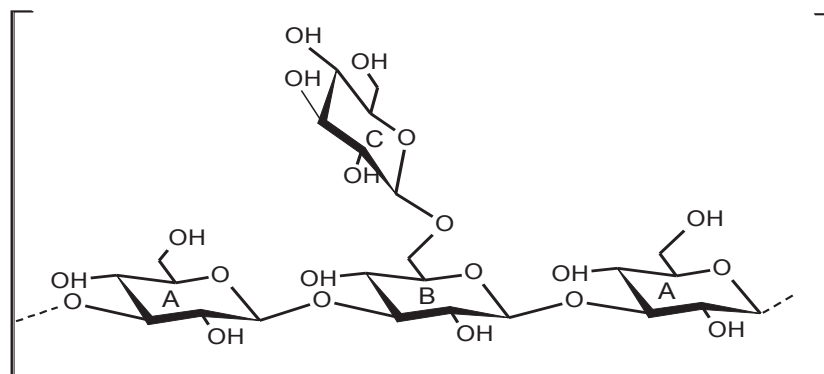


NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

Conclui-se que a estrutura do polissacarídeo presente na fração aquosa obtida da microalga *P. gyrans* e solúvel em tratamento de gelo-degelo (FIGURA 19) é composta por unidades de β -glucopiranosose-(1 \rightarrow 3)-ligadas (denominadas de unidades A para efeito didático), unidades de glucopiranosose β -(1 \rightarrow 3)-ligadas e

substituídas em O-6 (unidades B), e TNR de glucose (unidades C), indicando que essa fração é constituída por uma cadeia de β -glucanas-(1 \rightarrow 3,6)-altamente ramificadas.

FIGURA 19 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA O POLISSACARÍDEO DA FRAÇÃO PGAQ-S



Na sequência é apresentada a TABELA 5, onde estão dispostos todos os assinalamentos de carbono e dos polissacarídeos presentes nas frações PGAQ-P e PGAQ-S.

TABELA 5 - ASSINALAMENTOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES PGAQ-P E PGAQ-S DE *Pavlova gyrans*

	PGAQ-P	PGAQ-S		
	β -glucana (1 \rightarrow 3)	β -glucana (1 \rightarrow 3,6)		
	\rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	\rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (A)	\rightarrow 3,6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow (B)	β -D-Glcp-(1 \rightarrow (C)
C-1	102,7	102,8	102,8	103,8
C-2	72,6	72,6	72,6	73,6
C-3	86,0	86,0	87,3	76,5
C-4	68,2	68,2	nd	70,0
C-5	76,2	76,0	74,7	76,2
C-6	60,7	60,7	68,0	60,9
H-1	4,53	4,53	4,36	4,38
H-2	3,31	3,31	3,31	3,12
H-3	3,49	3,49	3,39	nd
H-4	3,27	3,27	nd	3,13
H-5	3,28	3,26	3,39	nd
H-6	3,72	3,72	4,01	nd
H-6'	3,48	3,48	3,67	nd

nd: não determinado

No espectro de ^1H da fração PGAQ-P (FIGURA 12) pode-se observar, mesmo que em baixa intensidade, os sinais posteriormente assinalados (na fração PGAQ-S) como sendo referentes ao H-1 de unidades de glucose di-substituídas e TNR de glucose em aproximadamente 4,38 e 4,40 ppm. Isso indica a presença de uma molécula predominantemente linear, porém com traços de ramificação. O grau de ramificação destas moléculas foi estimado pela avaliação da integração das áreas dos sinais correspondentes aos H-1 da unidade O-3-ligada, di-substituída e TNR. Isso foi feito no espectro de ^1H da fração PGAQ-P (pelo fato dos sinais estarem em baixa intensidade, apenas no espectro de ^1H foi possível distingui-los do ruído neste experimento) e de HSQC na fração PGAQ-S, devido a sobreposição dos sinais no espectro de ^1H (TABELA 6).

A integração das áreas na fração PGAQ-P mostra que a proporção de unidades O-3-ligada para di-substituída e TNR é de 100:4:4, o que indica um baixo grau de ramificação, apenas 1 unidade ramificada a cada 25 unidades O-3-ligada. Enquanto na fração PGAQ-S a proporção é de 100:90:60, indicando que praticamente todas as unidades são (1 \rightarrow 3,6)-ligadas. Para o sinal referente ao TNR na fração PGAQ-S foi observada uma área relativa menor que o esperado, visto que esta deveria aproximar-se de 0,9, uma vez que cada unidade é substituída necessariamente por um TNR. Entretanto, esse resultado é considerado indicativo do alto grau de ramificação.

TABELA 6 - INTEGRAÇÃO DE SINAIS DA REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES PGAQ-P E PGAQ-S

Fração	Pico	Tipo de unidade	Área Relativa
PGAQ-P ^a	4,53	$\rightarrow 3$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	1
	4,38	$\rightarrow 3,6$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	0,04
	4,40	TNR	0,04
PGAQ-S ^b	4,53	$\rightarrow 3$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	1
	4,36	$\rightarrow 3,6$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	0,9
	4,38	TNR	0,6

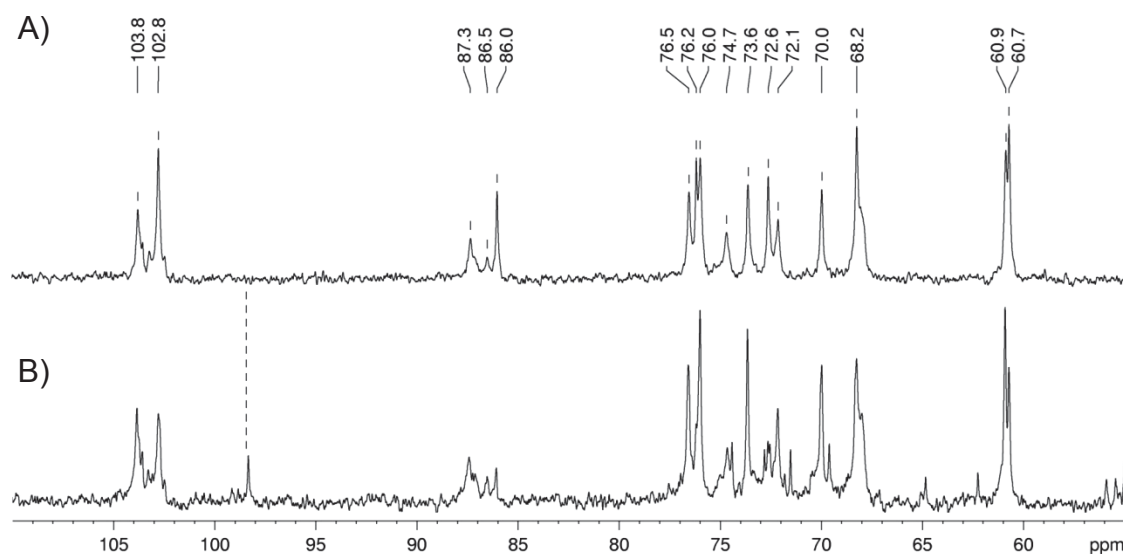
NOTA: ^a: integração realizada no espectro de RMN de ^1H ; ^b: integração realizada no espectro de RMN de HSQC.

Os resultados das análises de HPSEC-MALLS-RID, as quais indicam a presença de duas moléculas de tamanho molecular distintos tanto na fração PGAQ-

P quanto na fração PGAQ-S (FIGURA 10 A e B), foram relacionados aos resultados observados nas análises de RMN, os quais mostram espectros claramente compostos por apenas um tipo de molécula, de baixo grau de ramificação (PGAQ-P) ou alto grau de ramificação (PGAQ-S). Esses resultados mostram que se trata do mesmo polissacarídeo (mesma estrutura química), entretanto, presente nas frações em diferentes tamanhos moleculares. De acordo com a intensidade do pico detectado pelo RID, em aproximadamente 55 min, a concentração do polissacarídeo de menor massa molecular é predominante em ambas as frações.

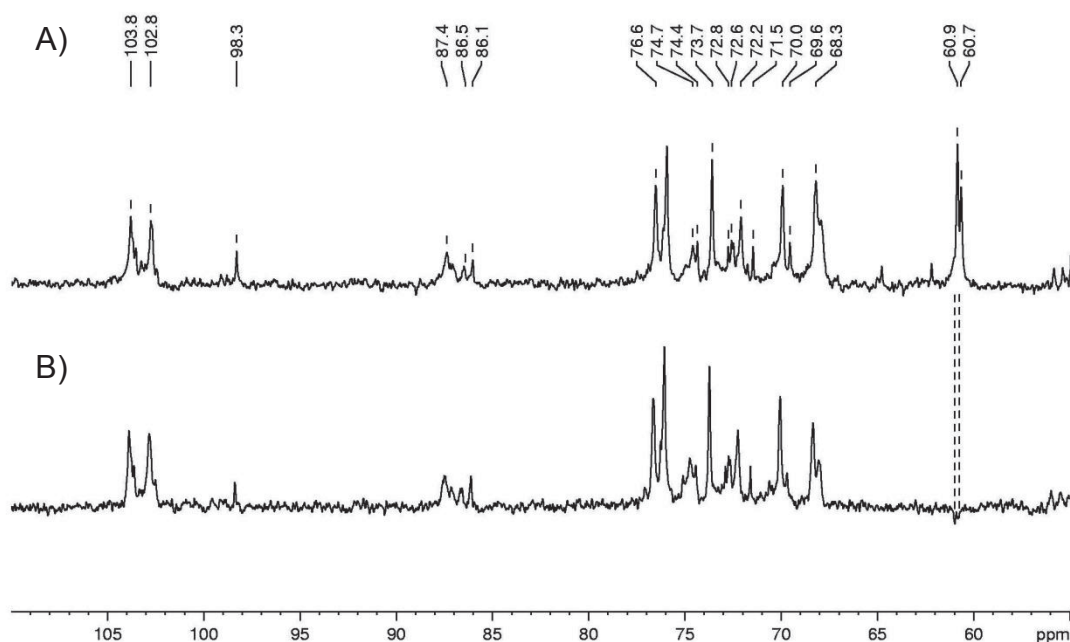
Constatou-se que o fracionamento por gelo-degelo foi o responsável pela separação de β -glucanas lineares de β -glucanas ramificadas, por solubilidade diferencial em água fria, esse efeito já havia sido anteriormente observado como relatado por RUTHES *et al.* (2015). As glucanas presentes na fração PGAQ-P, com baixo grau de ramificação, permanecem insolúveis em água fria devido a sua baixa capacidade de interagir com água devido ao fato de terem menos hidroxilas livres para pontes de hidrogênio, por exemplo. Já as glucanas altamente ramificadas por TNR de glucose apresentam maior capacidade de interação com a água.

Com relação à fração obtida através do sobrenadante etanólico da extração aquosa (PGAQ-SE), esta apresentou espectro muito similar a fração PGAQ-S (FIGURA 20 A). A fração apresenta basicamente os mesmos sinais da fração discutida anteriormente, exceto pelo aparecimento de um sinal em aproximadamente 98 ppm (indicado pela linha pontilhada).

FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PGAQ-S (A) E PGAQ-SE (B)

NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

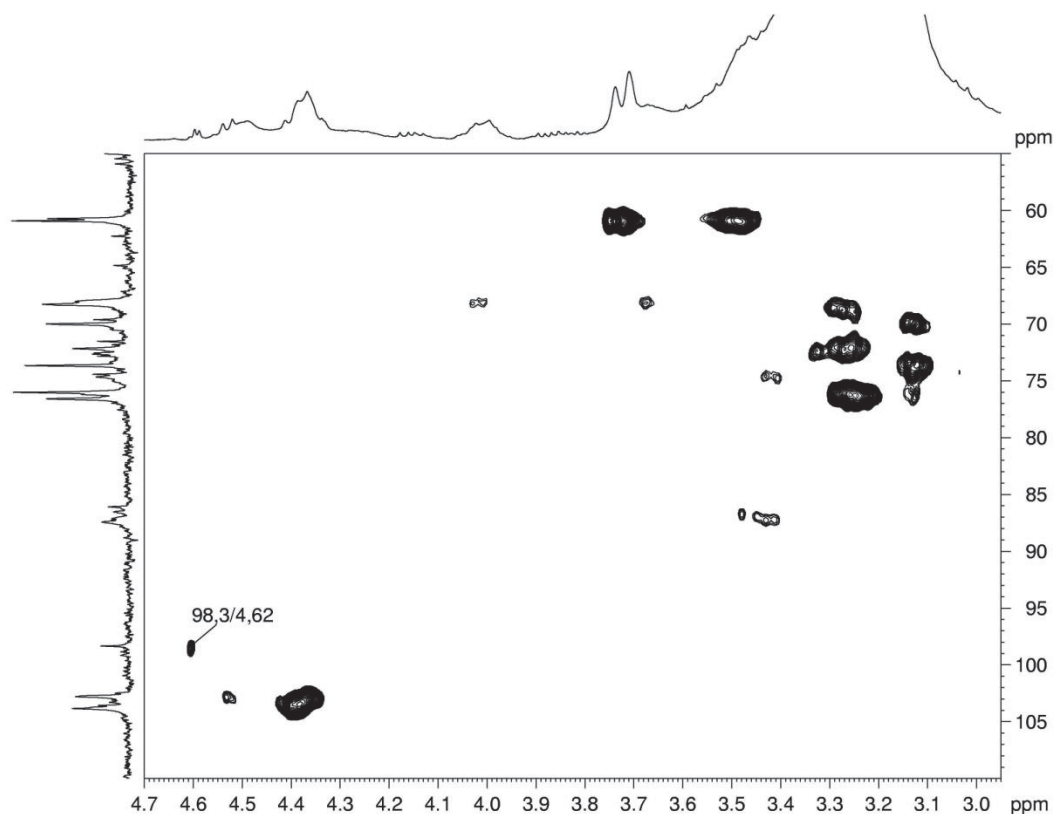
Analisando o experimento de DEPT realizado na fração PGAQ-SE (FIGURA 21 B) é possível observar a inversão apenas dos sinais em 60,7 e 60,9 ppm (indicados pela linha pontilhada), referentes ao C-6 livre das unidades de glucose di-substituídas e TNR de glucose, respectivamente. Assim como na fração PGAQ-S, não é possível observar a inversão do sinal de C-6 substituído em 68,0 ppm, entretanto a similaridade entre os espectros indica que trata-se de uma molécula (1→3,6)-ligada. Visto isso, conclui-se que o sinal em 98,3 ppm, possivelmente, refere-se ao carbono anomérico de terminais redutores de glucose presentes em solução, e que são susceptíveis ao fenômeno de mutarotação. A observação de sinais de unidades de terminal redutor só é possível em moléculas de baixa massa molecular, o que é esperado visto que se trata de moléculas que não precipitaram com EtOH.

FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PGAQ-SE (A) E DEPT 135 (B)

NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

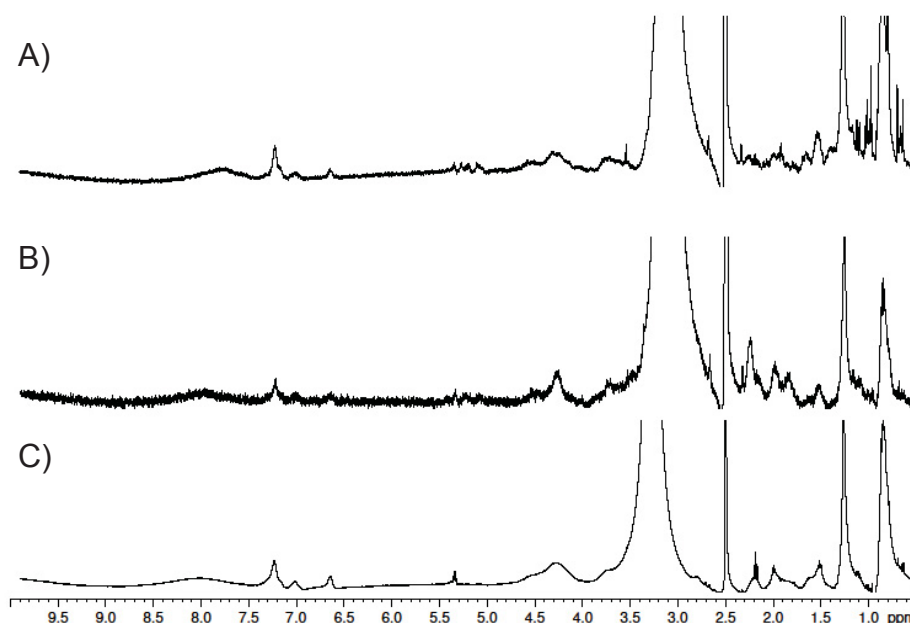
No experimento de HSQC da fração PGAQ-SE (FIGURA 22), foi verificada uma correlação do sinal em 98,3 ppm do espectro de RMN ^{13}C e o sinal em 4,62 ppm do RMN de ^1H , que foi assinalada como C-1/H-1 de terminais redutores de glucose. A constante de acoplamento deste sinal foi de 7,6 Hz, indicando se tratar do H-1 do anômero β de unidades de glucose, terminal redutor. Esse assinalamento está de acordo com o descrito por SASSAKI *et al.* (2014) para a glcp. Além disso, foi possível observar as demais correlações já destacadas para a fração PGAQ-S.

FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PGAQ-SE



NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

As frações derivadas do extrato alcalino foram submetidas às análises de RMN de ^1H (FIGURA 23). Não foram observados sinais relacionados a polissacarídeos (entre 3 e 6 ppm). Entretanto, entre 0,5 e 2 ppm foram observados sinais intensos correspondentes a hidrogênios de grupos metílicos de proteínas, entre 4 e 6 sinais referentes aos hidrogênios ligado ao carbono α , e entre 7 e 8,5 ppm sinais referentes aos hidrogênios de grupamentos amida (SILVERSTEIN *et al.*, 2010). O sinal em aproximadamente 3,1 ppm é referente a água.

FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES PGAL-P (A), PGAL-S (B) E PGAL-SE (C)

NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C. Sinal referente ao CH_3 do DMSO em 2,50 ppm.

Na sequência serão apresentados os dados referentes à análise de metilação das frações derivadas do extrato aquoso.

4.3.4 Análise de Metilação

As frações PGAQ-P e PGAQ-S foram submetidas a análise de metilação (TABELA 7) para confirmação da posição das ligações glicosídicas. A fração PGAQ-P apresentou 90 % do derivado 2,4,6- $\text{Me}_3\text{-Glc}$, correspondente às unidades de glucose (1 \rightarrow 3)-ligadas. Isso confirma que a cadeia principal do polímero é formada por ligações glicosídicas entres os carbonos 1 e 3 das unidades de glucose. Conforme discutido anteriormente, com os dados obtidos através da integração de áreas no espectro de RMN de ^1H desse polissacarídeo, a fração PGAQ-P não é totalmente linear, embora o grau de ramificação seja bem baixo. Isso foi confirmado pelo teor de 1,8 % do derivado 2, 4- $\text{Me}_2\text{-Glc}$, o qual indica unidades de glucose O-3 e O-6 substituídas. Além disso, também foi observado que o percentual de TNR de glucose (7,2 %) foi superestimado por essa análise, uma vez que não foram

detectados outros pontos de ramificação na molécula o teor de TNR deveria ser aproximadamente o mesmo de unidades dissubstituídas.

TABELA 7 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES AQUOSAS DE *P. gyrans*

<i>Derivado</i>	<i>PGAQ-P</i>	<i>PGAQ-S</i>	<i>Ligação</i>
2,3,4,6 – Me ₄ -Glc	7,2	44,3	Glc _p -1(→
2,4,6 – Me ₃ -Glc	90,1	31,0	→3)-Glc _p -(1→
2, 4 – Me ₂ -Glc	1,8	24,7	→3,6)-Glc _p -(1→

Na análise de metilação da fração PGAQ-S observou-se que esta molécula é altamente ramificada, principalmente devido ao percentual de aproximadamente 25 % de unidades substituídas em O-3 e O-6, representadas pelo derivado 2, 4–Me₂-Glc, confirmando a análise feita pela integração de áreas no espectro de RMN de ¹H desta fração.

O percentual de TNR de glucose foi identificado pela presença do derivado 2,3,4,6 – Me₄-Glc (44,3 %), esse teor, entretanto, está superestimado visto o percentual 20 % menor de unidades di-substituídas.

4.4 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS DE *P. lutheri*

4.4.1 Extração e caracterização química dos polissacarídeos

Os rendimentos correspondentes e composição monossacarídica das frações derivadas da extração aquosa e alcalina da microalga *P. lutheri* estão descritos na TABELA 8. Para as frações aquosas o rendimento foi variável entre 0,6 e 4,7 %, enquanto para os extratos os alcalinos o rendimento variou entre 0,9 e 5,4 %.

Na análise da caracterização química das frações obtidas de *P. lutheri* verificou-se que as frações derivadas do extrato aquoso foram as que apresentaram maior teor de carboidratos, variando entre 27, 2 e 55,6 %, enquanto os extratos alcalinos concentram maior teor de proteínas variando de 34,7 a 60,6 %.

TABELA 8 - ANÁLISE QUÍMICA E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (mol %) DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA *Pavlova lutheri*

Amostra	Rend.	Cho ^a	Ptn ^b	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Extratos aquosos										
PLAQ-P	0,6	55,6	14,5	2,1	2,5	tr ^c	tr ^c	1,5	2,0	91,2
PLAQ-S	4,7	59,9	17,9	3,1	11,4	tr ^c	tr ^c	2,0	3,3	78,3
PLAQ-SE	0,9	27,2	12,3	tr ^c	tr ^c	tr ^c	tr ^c	3,7	4,9	91,4
Extratos alcalinos										
PLAL-P	1,0	15,2	49,1	8,3	7,8	3,0	5,1	14,2	17,6	44,0
PLAL-S	0,9	17,5	34,7	5,5	7,7	8,2	8,1	15,4	24,9	30,2
PLAL-SE	5,4	39,4	60,6	2,8	6,8	10,9	13,0	14,0	25,2	27,3

NOTA: ^a: Carboidratos; ^b: Proteínas; ^c: traço ≤ 1 mol %; nd: não detectado. Rha corresponde a ramnose, Fuc a fucose, Ara a arabinose, Xyl a xilose, Man a manose, Gal a galactose, Glc a glucose.

A composição monossacarídica dos extratos de *P. lutheri* mostrou que as frações aquosas são majoritariamente compostas por glucose, apresentando entre 78,3 e 91,4 % desse monossacarídeo. As frações derivadas do extrato alcalino mostram-se bastante heterogêneas quanto a sua composição monossacarídica, a glucose foi o monossacarídeo presente em maior concentração nessas frações, (27,3 a 44,0 %), seguido de galactose (17,6 a 25,2 %) e manose (14 a 15,4 %). Esses resultados indicam que as frações aquosas são compostas por glucanas, possivelmente constituídas na maior parte pelo polissacarídeo de reservas destas microalgas. O elevado teor de proteínas, baixo teor de carboidratos e heterogeneidade de açúcares observado nas frações alcalinas, associado ao fato de que a extração em meio básico é uma condição mais brusca, indica que essas frações devem ser compostas por proteínas glicosiladas, possivelmente componentes da parede celular.

Os resultados das análises químicas em extratos obtidos da microalga *P. lutheri* mostraram grande similaridade com os discutidos anteriormente para a microalga *P. gyraus*, mostrando que embora se trate de espécies distintas a composição química das algas é muito semelhante.

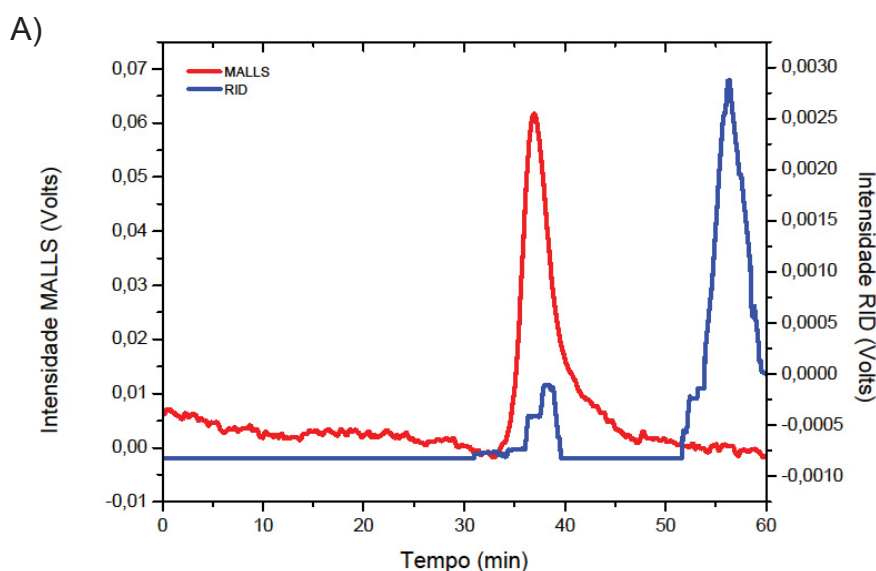
Na sequência serão analisados os resultados da análise de homogeneidade destas frações.

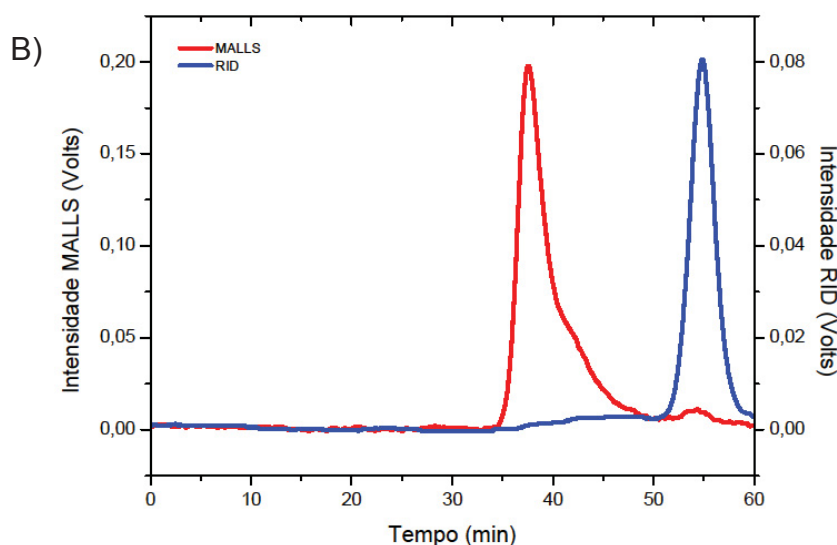
4.4.2 Análises de homogeneidade por HPSEC-MALLS-RID

As frações aquosas de *P. lutheri* foram submetidas às análises por HPSEC-MALLS (FIGURA 24 A e B). Analisando o cromatograma é possível observar que a fração PLAQ-P (FIGURA 24 A) apresentou um pico polidisperso detectado pelo espalhamento de luz em aproximadamente 40 min, o qual foi detectado pelo índice de refração em menor proporção quando comparado com o pico em aproximadamente 60 min. Este pico em 60 min não foi detectado pelo espalhamento de luz, o que associado ao tempo de eluição, indica que se trata de uma molécula de menor massa molecular.

A fração PLAQ-S apresentou perfil de eluição muito semelhante ao da fração PLAQ-P. Os resultados obtidos indicam que essas frações são compostas basicamente por duas moléculas de tamanhos distintos. Os resultados obtidos nas análises de homogeneidade de frações aquosas da microalga *P. lutheri* indicam mais uma vez (como já discutido em relação à composição química das frações) a similaridade entre elas.

FIGURA 24 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES PLAQ-P (A) E PLAQ-S (B)



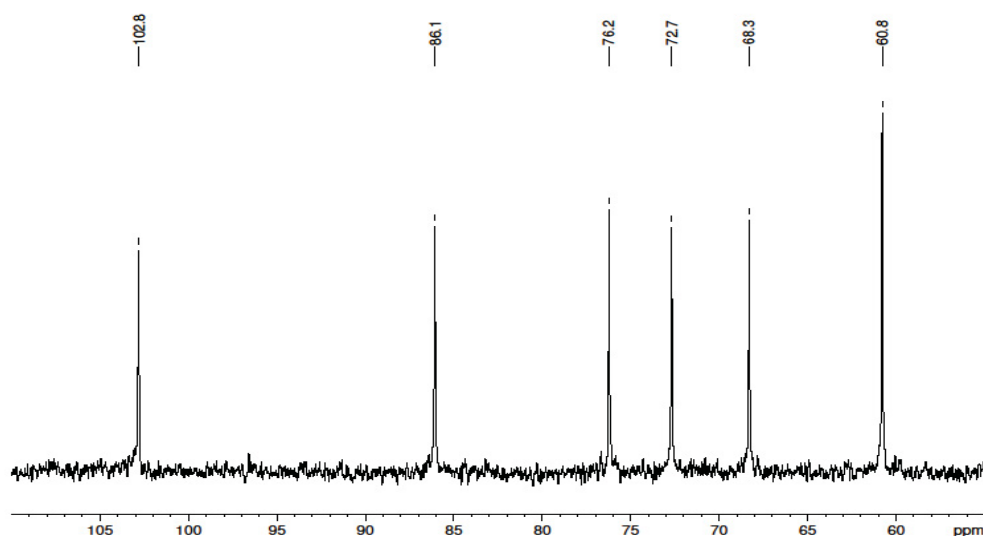


Com base nos resultados analisados anteriormente para as frações PGAQ-P e PGAQ-S, concluiu-se que o pico detectado apenas pelo detector de IR próximo a 60 min é referente a β -glucana-(1 \rightarrow 3,6)-ligada. O tempo de eluição determinado para β -glucanas ramificadas foi o mesmo observado em outros trabalhos (RUTHES *et al.*, 2013; AMARAL *et al.*, 2008) para esse tipo de polissacarídeo extraído de fungos.

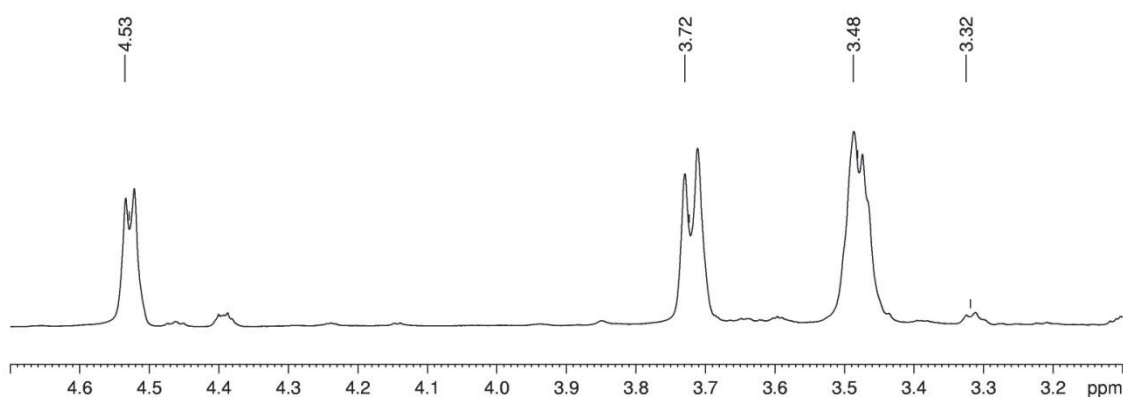
Na sequência serão analisados os resultados referentes as análises de RMN das frações obtidas de *P. lutheri*.

4.4.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das frações obtidas da microalga *P. lutheri*

No espectro de ^{13}C da fração PLAQ-P (FIGURA 25), é possível observar seis sinais únicos que representam os seis carbonos da unidade de glucose (açúcar majoritário de acordo com análise da composição monossacarídica). Esses sinais em 102,8, 72,7, 86,1, 68,3, 76, 2 e 60,8 correspondem ao C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6, respectivamente da unidade de glucose. Indicando que essa fração é composta por β -glucanas-(1 \rightarrow 3)ligadas.

FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PLAQ-P

NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

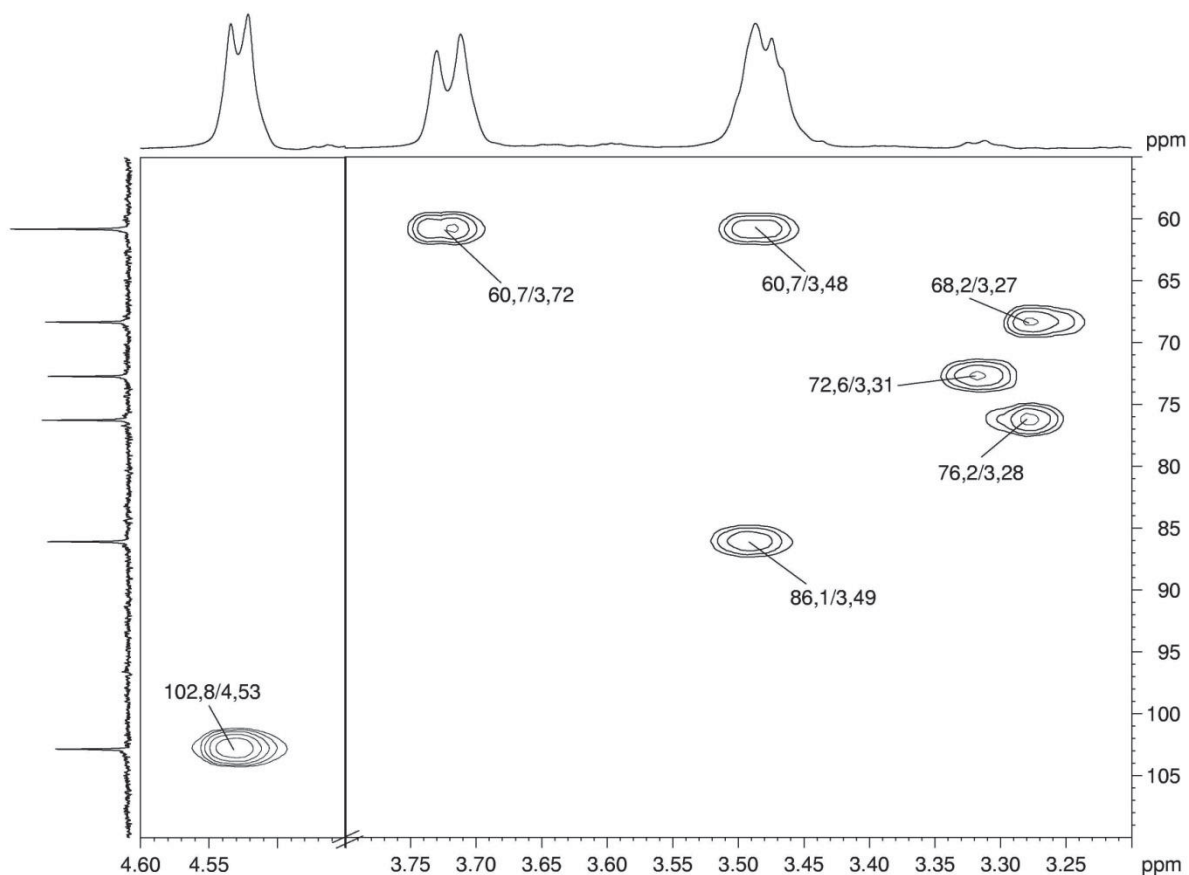
FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PLAQ-P

NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

Com relação ao espectro de ^1H da fração PLAQ-P (FIGURA 26) são observados sinais em 4,53, 3,72 e 3,48 ppm e outros de menor intensidade em aproximadamente 3,30 e 4,40 ppm. O assinalamento de todos os sinais presentes no espectro de ^1H foi possível através do experimento de HSQC (FIGURA 27), no qual estão presentes seis correlações. Em 102,8/4,53 ppm, a correlação referente à C-1/H-1 (deslocamentos que comprovam a anomericidade β da ligação), em 72,6/3,31 ppm referente a C-2/H-2, em 86,1/3,49 ppm correspondente a C-3/H-3 (deslocamento para campo baixo de C-3 indicado a ligação glicosídica), em

68,2/3,27 ppm referente a C-4/H-4, em 76,2/3,28 ppm correspondente a C-5/H-5 e em 60,7/3,72;3,48 ppm referente C-6/H-6;H-6' livres. Esses sinais mostraram que a fração PLAQ-P é composta β -glucana-(1 \rightarrow 3)-ligada.

FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PLAQ-P



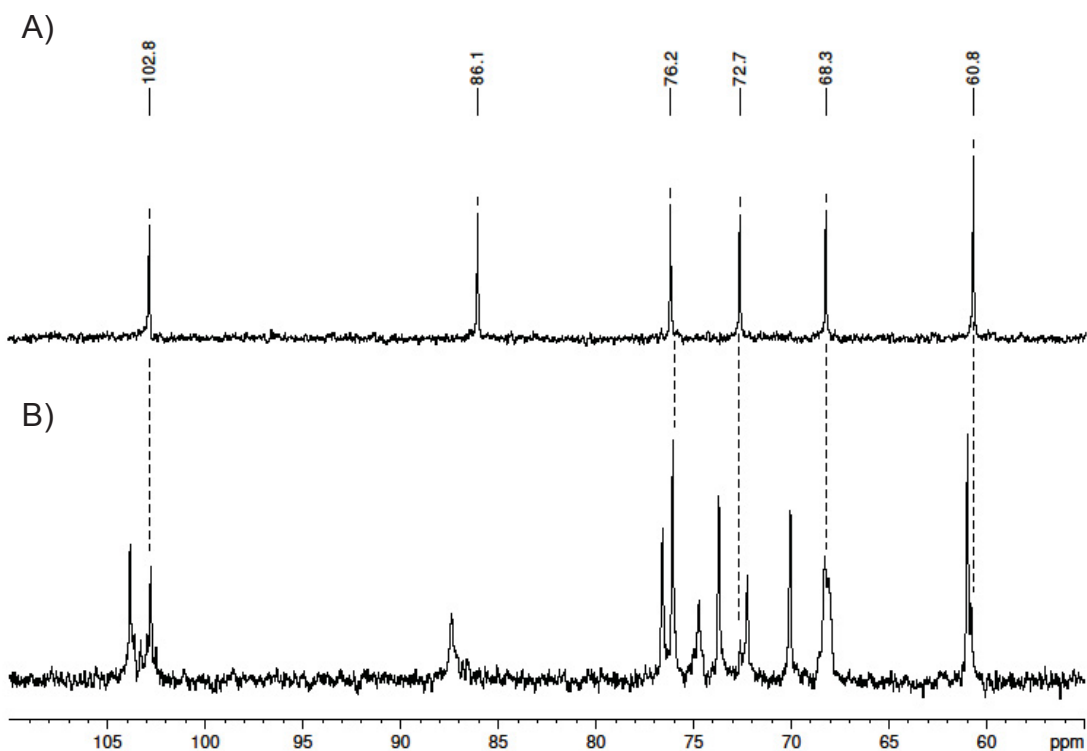
NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

Os assinalamentos realizados estão de acordo com os descritos para β -glucanas-(1 \rightarrow 3)-ligadas extraídas de fungos (GORIN, 1981; CARBONERO *et al.*, 2006; RUTHES *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2014), além de serem os mesmos descritos para fração aquosa oriunda da precipitação por gelo-degelo da microalga *P. gyrams*.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração aquosa solúvel em gelo-degelo (PLAQ-S) mostrou-se mais complexo quando comparado a fração PLAQ-P (FIGURA 28). É possível observar que pelo menos cinco dos seis sinais presentes na fração PLAQ-P, estão também presentes na fração PLAQ-S (indicado pela linha pontilhada), sendo que alguns como C-1 e C-6 em 102,8 e 60,8 ppm, respectivamente

encontram-se em menor intensidade em relação aos demais. Na fração PLAQ-S, está presentes também, um sinal na região de C-3 ligados, entretanto deslocados para mais ppm (~87,4 ppm), quando comparados ao sinal da molécula predominantemente linear (86,1 ppm). Isso pode indicar a presença de substituições. A complexidade da molécula também é indicada pelo aparecimento de outros sinais na região anomérica e na região do anel (entre 68 e 80 ppm).

FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PLAQ-P (A) E PLAQ-S (B)

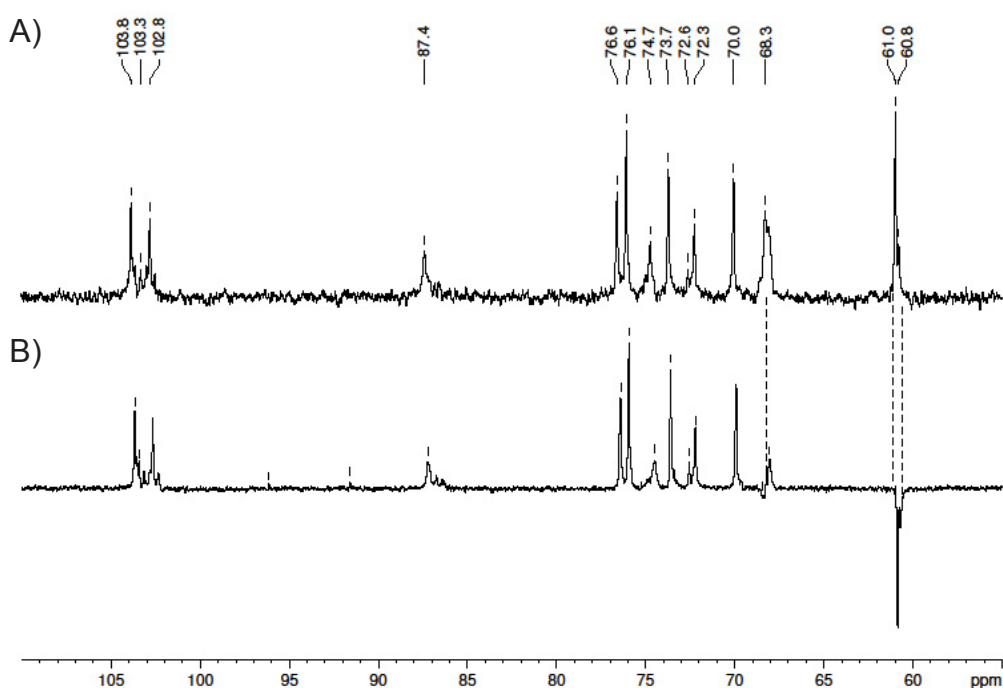


NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT da fração PLAQ-S (FIGURA 29), observa-se a inversão (indicadas pelas linhas pontilhadas) dos sinais de C-6 livres em 60,8 e 61,0 ppm, e menos evidente devido a intensidade, a inversão do sinal em 68,3 ppm. O deslocamento para campo baixo do sinal de C-6 é característico quando este carbono está substituído por outro monossacarídeo ou grupamento químico.

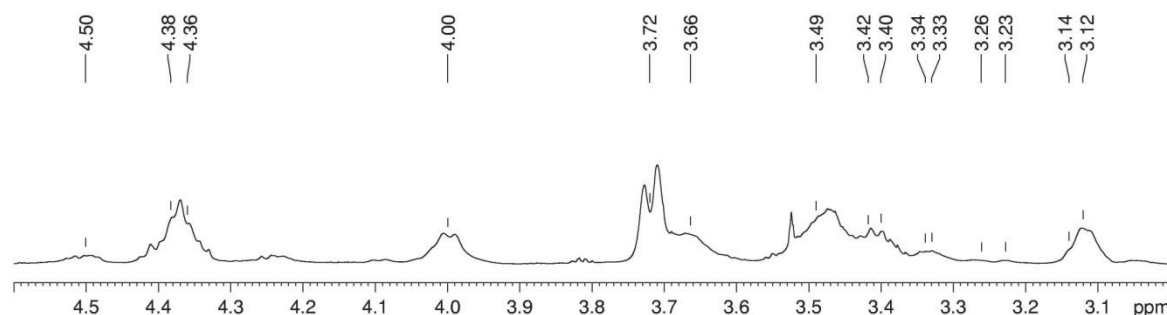
A análise dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT da fração PLAQ-S (FIGURA 29) indicaram grande semelhança com a fração correspondente obtida de *P. gyrans* (PGAQ-S), indicando que a fração é composta por β -glucanas ramificadas (1 \rightarrow 3,6)-ligadas. Esses resultados foram confirmados pela análise do espectro de HSQC discutido na sequência.

FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PLAQ-S (A) E DEPT 135 (B)



NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

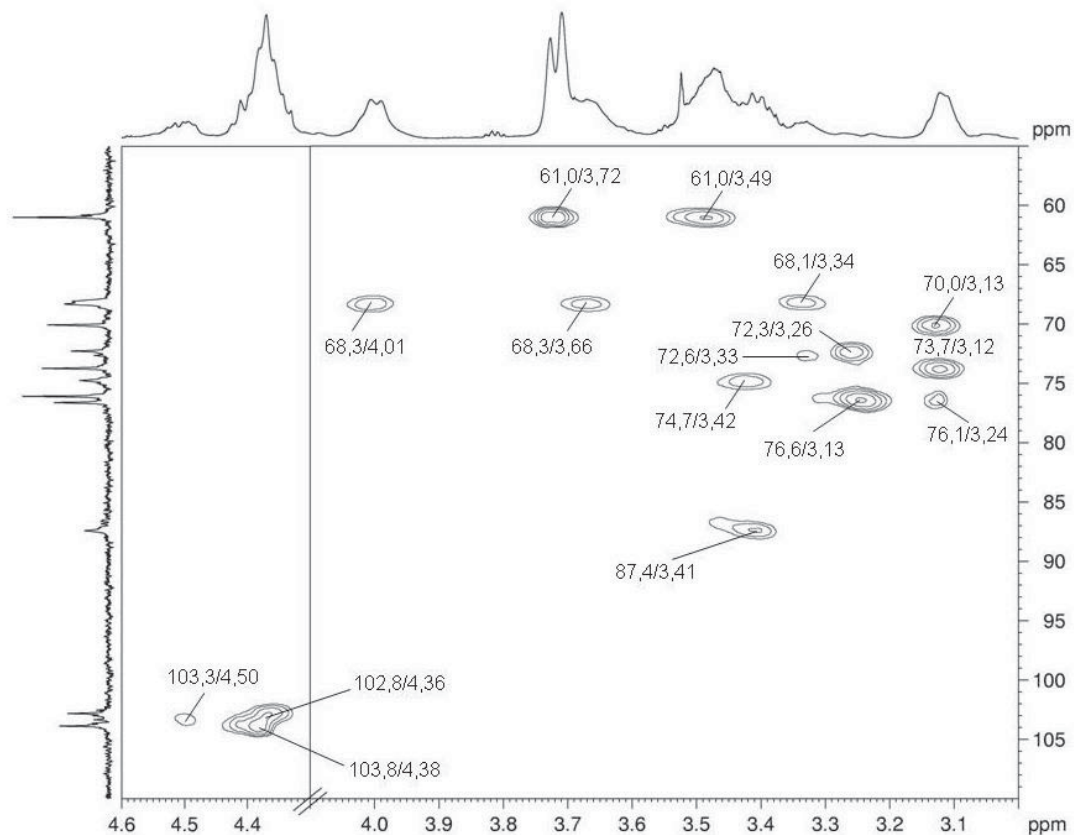
O espectro de RMN de ^1H da fração PLAQ-S (FIGURA 30) também revela a complexidade da molécula, entretanto o assinalamento completo só foi possível através do experimento de HSQC desta fração (FIGURA 31).

FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PLAQ-S

NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

De acordo com as correlações observadas no experimento de HSQC (FIGURA 31), os sinais em baixa frequência 4,50, 4,36 e 4,38 ppm correspondem aos sinais de H-1 de unidades glucose β -(1 \rightarrow 3)-ligadas, β -(1 \rightarrow 3,6)-ligadas e TNR. A substituição em O-6 é confirmada pela presença de duas correlações para o sinal em 68,3/4,01; 3,66 (C-6/H-6; H-6'), a ligação é C-3 é representada pela correlação em 87,4/3,41 (C-3/H-3) das unidades (1 \rightarrow 3,6)-ligadas, enquanto as outras correlações observadas, entre 68 e 77 ppm, estão relacionadas aos demais carbonos e hidrogênios do anel de glucose β -(1 \rightarrow 3)-ligado: C-2 (72,3/3,26), C-4 (68,1/3,34) e C-5 (76,1/3,24); glucose β -(1 \rightarrow 3,6)-ligada: C-2 (72,6/3,33) e C-5 (74,7/3,42); e TNR de glucose C-2 (73,7/3,12), C-3 (76,6/3,13), C-4 (70,0/3,13).

FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PLAQ-S



NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

Os assinalamentos observados estão de acordo com o descritos para outras β -glucanas-(1 \rightarrow 3,6)-ligadas extraídas de fungos (RUTHES *et al.*, 2013; CARBONERO *et al.*, 2012; AMARAL *et al.*, 2008; RUTHES *et al.*, 2008; CARBONERO *et al.*, 2006; BAO *et al.*, 2001; CHENGHUA *et al.*, 2000; REIS *et al.*, 2002).

No espectro de RMN de ^1H verifica-se que a fração PLAQ-P também apresenta picos de menor intensidade em aproximadamente 4,39 e 4,40 ppm, referentes a presença de unidades de glucose β -(1 \rightarrow 3,6)-ligadas e TNR de glucose. Isso mostra que embora a fração seja composta por uma cadeia predominantemente linear, existem pontos de ramificação. Para estimativa da proporção de unidades (1 \rightarrow 3)-ligadas, (1 \rightarrow 3,6)-ligadas e TNR de glucose, foi feita a integração dos respectivos sinais na região anomérica do espectro de RMN de ^1H para a fração PLAQ-P (devido a baixa intensidade dos sinais correspondentes nos demais espectros) e HSQC para a fração PLAQ-S, devido a sobreposição de sinais no espectro de ^1H (TABELA 9).

TABELA 9 - INTEGRAÇÃO DE SINAIS DA REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES PLAQ-P E PLAQ-S

Fração	Pico	Tipo de unidade	Área Relativa
PLAQ-P ^a	4,53	→3)-β-D-Glcp-(1→	1
	4,39	→3,6)-β-D-Glcp-(1→	0,05
	4,40	TNR	0,05
PLAQ-S ^b	4,50	→3)-β-D-Glcp-(1→	0,1
	4,36	→3,6)-β-D-Glcp-(1→	1
	4,38	TNR	0,6

NOTA: ^a: integração realizada no espectro de RMN de ¹H; ^b: integração realizada no espectro de RMN de HSQC.

Foi observado que o grau de ramificação da fração PLAQ-P é muito baixo, uma vez que a proporção apresentada foi de 100:5:5 unidades β-(1→3)-ligadas, β-(1→3,6)-ligadas e TNR, respectivamente. Isso indica uma ramificação a cada 20 unidades da cadeia principal. Esse resultado foi muito semelhante ao observado na fração correspondente obtida da microalga *P. gyrams* (PGAQ-P), que apresentou uma ramificação a cada 25 unidades da cadeia principal ligada.

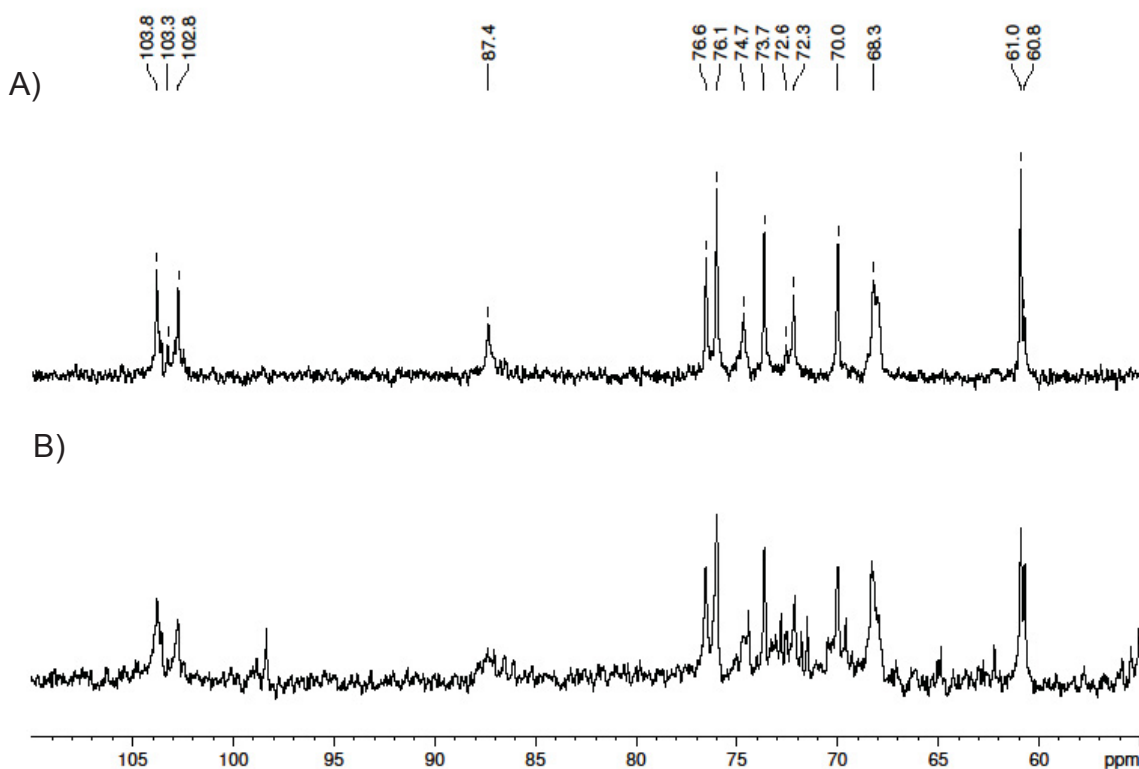
Com relação à fração PLAQ-S, foi verificado que a cadeia principal do polissacarídeo é constituída por unidades de glucose β-(1→3,6)-ligadas, enquanto apenas 10 % das unidades são β-(1→3)-ligadas. Isso indica um grau de ramificação ainda maior que o observado para fração PGAQ-S (fração correspondente da microalga *P. gyrams*). Esses resultados também mostram a separação das moléculas pelo tratamento de gelo-degelo, baseado na ramificação do polissacarídeo e sua capacidade de interação com a água fria.

Relacionando os resultados para análise de homogeneidade destas frações com a análise de RMN, conclui-se que devido a clareza dos espectros de RMN, estas frações devem ser compostas por dois tamanhos diferentes (eluídos em aproximadamente 40 e 60 min pelo HPSEC-MALLS) do mesmo polissacarídeo, glucanas β-(1→3,6)-ligadas com baixo grau de ramificação no caso da fração PLAQ-P e altamente ramificadas no caso de PLAQ-S, assim como observado para frações aquosas da obtidas da microalga *P. gyrams*.

Os carboidratos, presentes na fração do sobrenadante etanólico da extração aquosa PLAQ-SE, foram analisados por RMN de ¹³C. Foi observado perfil muito semelhante ao polissacarídeo da fração discutida anteriormente - PLAQ-S (FIGURA

32). Isso mostra que a fração PLAQ-SE é também, composta por β -glucanas ramificadas (1 \rightarrow 3,6)-ligadas. É possível observar o aparecimento de um sinal em aproximadamente 98 ppm que, possivelmente, refere-se ao carbono anomérico de terminais redutores de glucose, os quais são susceptíveis ao fenômeno de mutarotação. A observação de sinais de unidades de terminal redutor só é possível em moléculas de baixa massa molecular, o que é esperado visto que se trata de moléculas que não precipitaram com EtOH.

FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PLAQ-S (A) E PLAQ-SE (B)

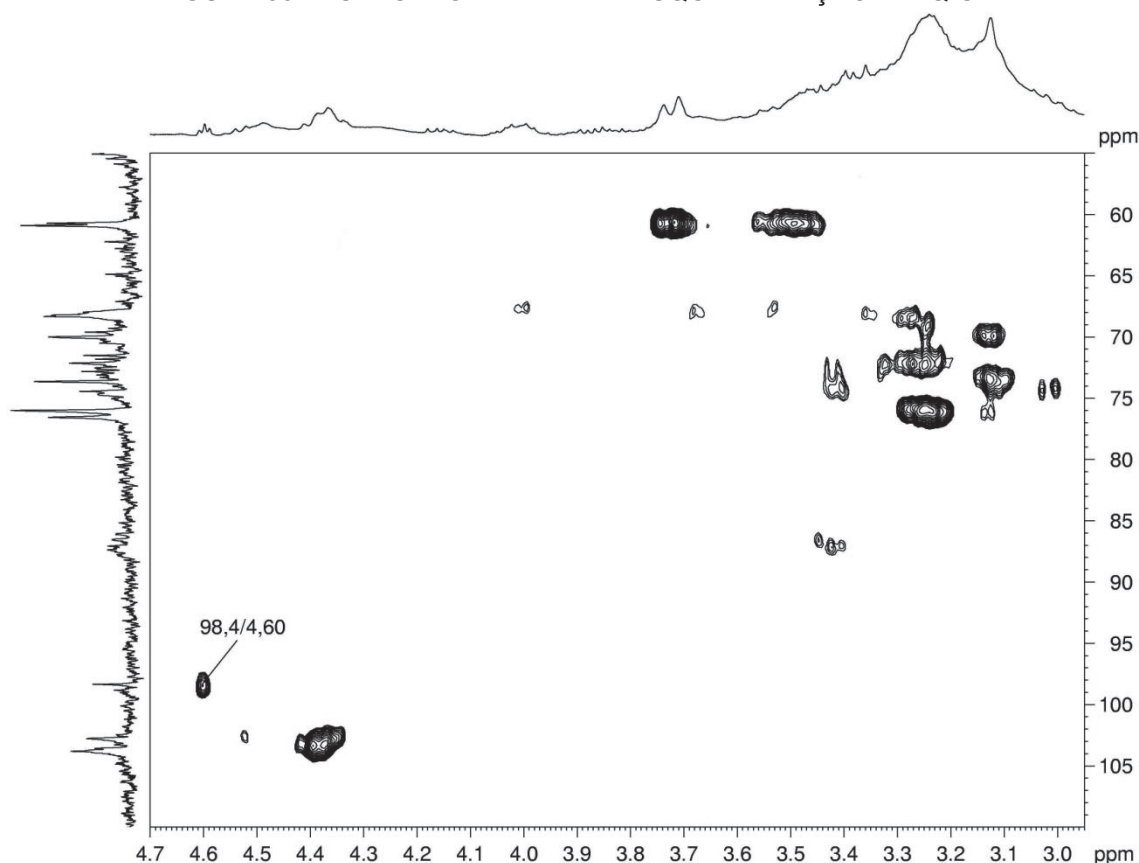


NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

O experimento de HSQC da fração PLAQ-SE (FIGURA 33), apresentou uma correlação do sinal em 98,4 ppm do espectro de RMN ^{13}C e o sinal em 4,60 ppm do RMN de ^1H , que foi assinalada como C-1/H-1 de terminais redutores de glucose. A constante de acoplamento deste sinal foi de 7,5 Hz, indicando se tratar do H-1 do anômero β de unidades de glucose, terminal redutor. Esse assinalamento está de

acordo com o descrito por SASSAKI *et al.* (2014) para a *glcp*. Além disso, foi possível observar as demais correlações já destacadas para a fração PGAQ-S.

FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO PLAQ-SE

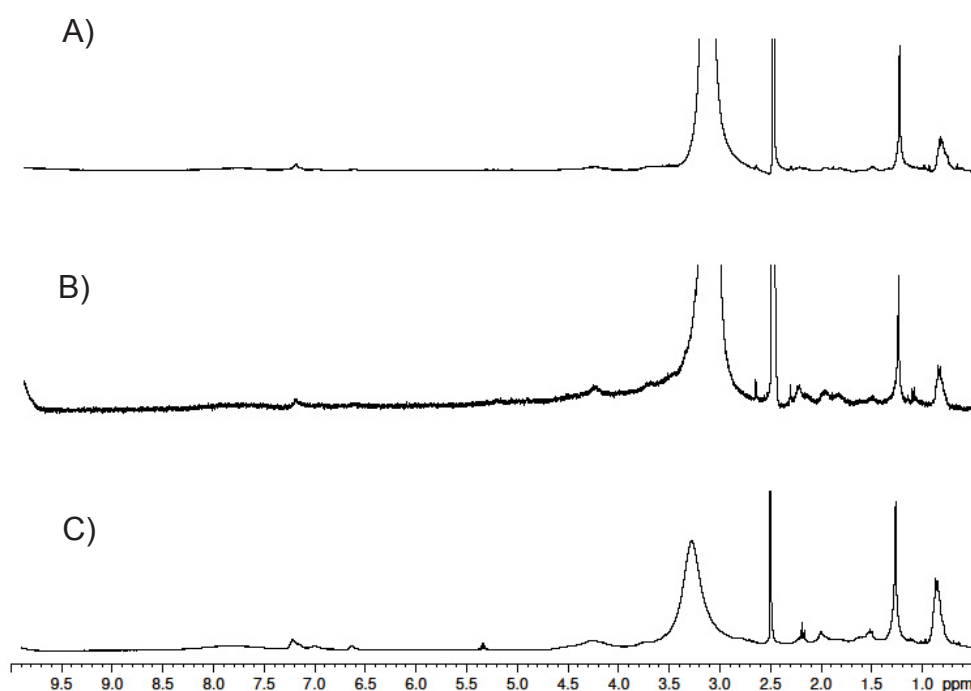


NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C.

As análises indicam que ambas as espécies estudadas produzem polissacarídeos constituídos por D-glucose, unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3), ou β -(1 \rightarrow 3,6), extraídos em água quente. Até o momento apenas dados relacionados à caracterização química fina de polissacarídeos de microalgas da divisão Haptophyta (família Primnesiophyceae) foram encontrados na literatura. Estes dados relatam β -glucanas de cadeia principal (1 \rightarrow 6)-ligada com substituição em O-3 por di ou trissacarídeos de glucose β -(1 \rightarrow 6) (VARUM *et al.*, 1986) ou β -(1 \rightarrow 3)-ligados (RIZZI, 2010). Os resultados observados com as microalgas estudadas neste trabalho (Divisão Haptophyta, família Pavlovophyceae) indicam que microalgas da mesma divisão, embora de famílias diferentes podem apresentar polissacarídeos distintos.

As frações derivadas do extrato alcalino foram submetidas às análises de RMN de ^1H (FIGURA 34) e apresentaram espectros muito similares entre si. Estas frações apresentaram entre 10 e 30 % de carboidratos. Entretanto, analisando os espectros de RMN de ^1H , não foram observados sinais relacionados a polissacarídeos (entre 3 e 6 ppm). Entre 0,5 e 2 ppm foram observados sinais intensos, correspondentes a hidrogênios de grupos metílicos de proteínas, entre 4 e 6 sinais referentes aos hidrogênios ligados ao carbono α , e entre 7 e 8,5 ppm sinais referentes aos hidrogênios de grupamentos amida (SILVERSTEIN *et al.*, 2010). O sinal em aproximadamente 3,1 ppm é referente a água.

FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PLAL-P (A), PLAL-S (B) E PLAL-SE (C)



NOTA: Solvente DMSO. Temperatura 70 °C

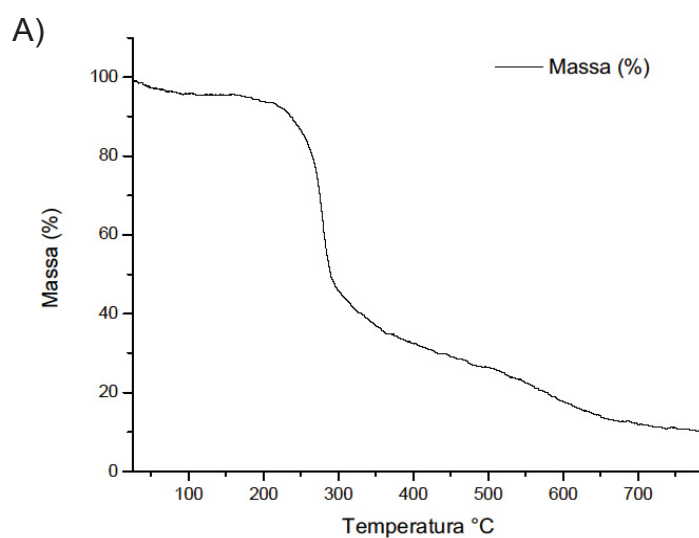
Esses resultados são os mesmos observados para frações alcalinas obtidas da biomassa de *P. gyrans*, o que mostra que a extração em solvente básico foi capaz de extrair proteínas da biomassa, enquanto que os polissacarídeos de reserva dessas microalgas são extraídos em água quente.

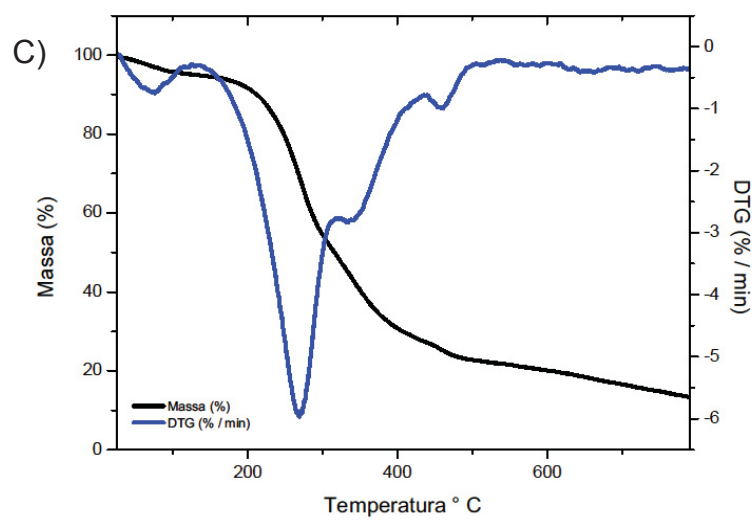
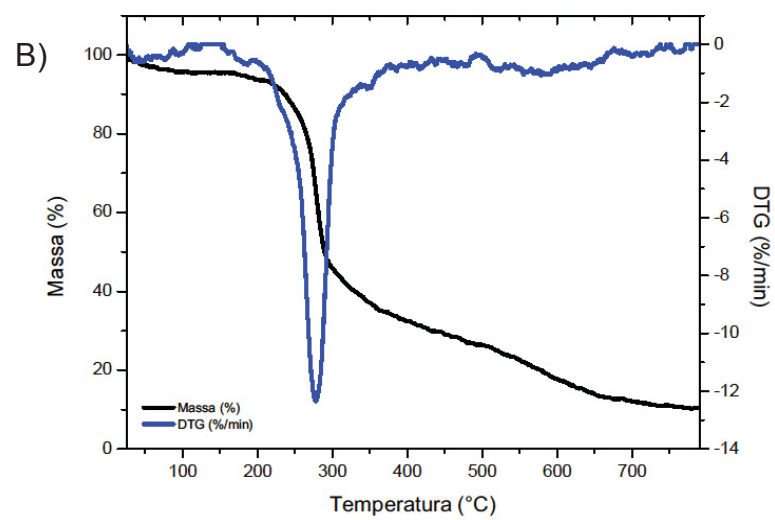
A seguir serão discutidos os dados referentes à degradação térmica das frações obtidas da microalga *P. lutheri*.

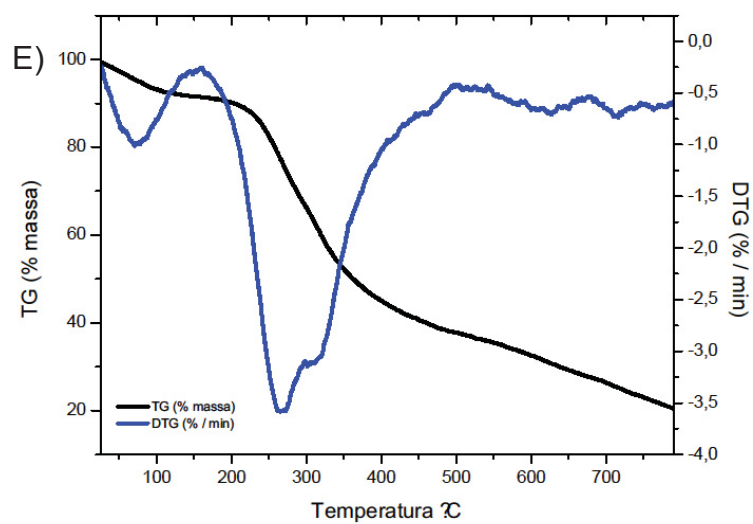
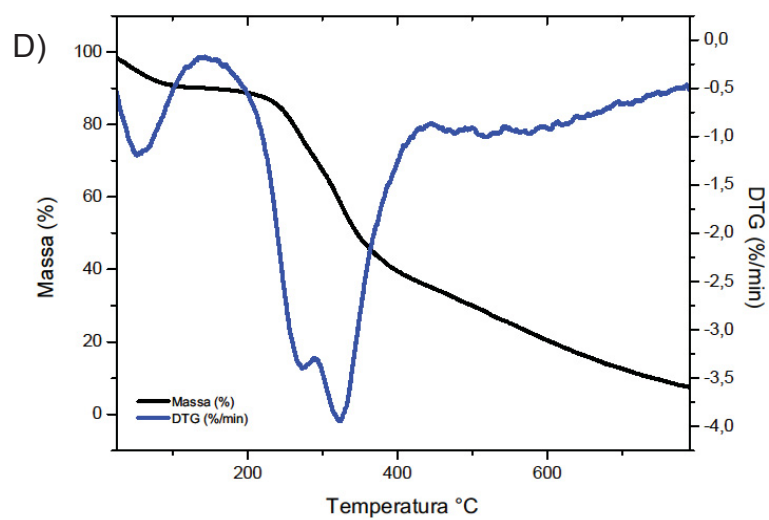
4.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DE *P. lutheri* e *P. gyrans*

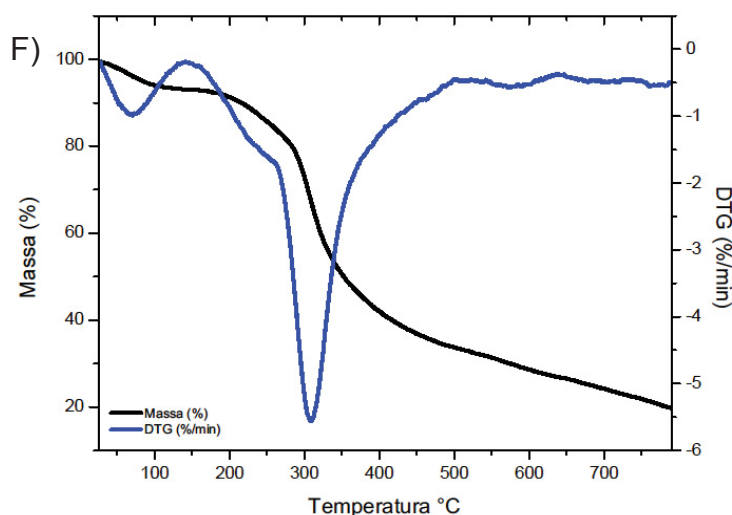
As frações derivadas da extração aquosa e alcalina da microalga *P. lutheri* foram avaliadas quanto as suas características de degradação térmica. Os resultados estão apresentados na FIGURA 35 e TABELA 10.

FIGURA 35 - PERDA DE MASSA E TAXA DE PERDA DE MASSA DOS EXTRATOS OBTIDOS DE *P. lutheri*: PLAQ-P (A) PLAQ-S (B) PLAQ-SE (C) PLAL-P (D) PLAL-S (E) PLAL-SE (F)









Os resultados das análises de TGA foram comparados com os valores obtidos através de dosagens colorimétricas. Foi observado maior teor de carboidratos nas frações aquosas e maior teor de proteínas nas frações alcalinas. Os termogramas das frações aquosas PLAQ-P e PLAQ-S apresentaram, de maneira geral, uma curva de perda de massa mais acentuada, com único pico de elevada taxa de degradação (DTG) em 277 °C, indicando que essa faixa corresponde à degradação térmica das β -glucanas presentes nesse extrato. Já, as frações alcalinas PLAL-P e PLAL-S apresentaram degradação em ampla faixa de temperatura e menor taxa de degradação, com picos próximos a 270 (273,0 e 271,5 °C, respectivamente) e 310 °C (322,4 e 310,1 °C, respectivamente), sendo que este último indicaria a degradação de proteínas. A fração PLAL-SE, apresentou um ombro próximo a 290 °C e um pico de degradação com alta taxa de degradação em 309,5 °C, esse dado é corroborado pela dosagem colorimétrica de proteínas que indicou que essa é a amostra com maior teor de proteínas 60,6 %.

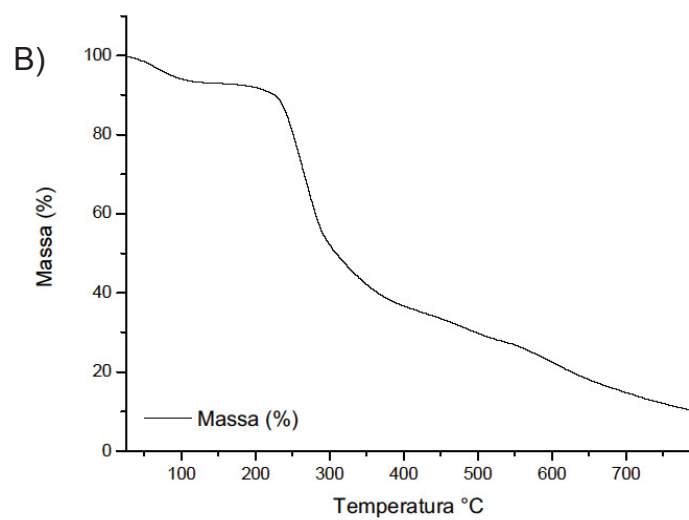
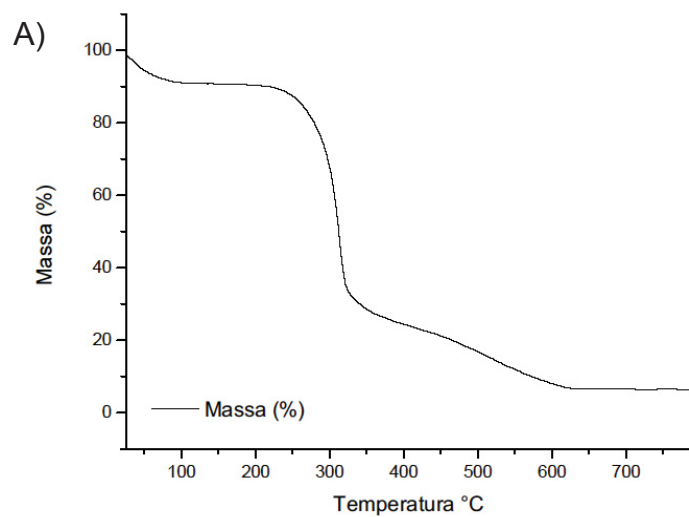
Segundo EL-SAYED e MOSTAFA (2014), este método promove a quantificação da umidade, matéria volátil e cinzas denominada “*proximate analysis*”, portanto os valores estimados de cada um destes “compostos” foram descritos em uma tabela com de acordo com os eventos observados nas curvas de TGA e DTG.

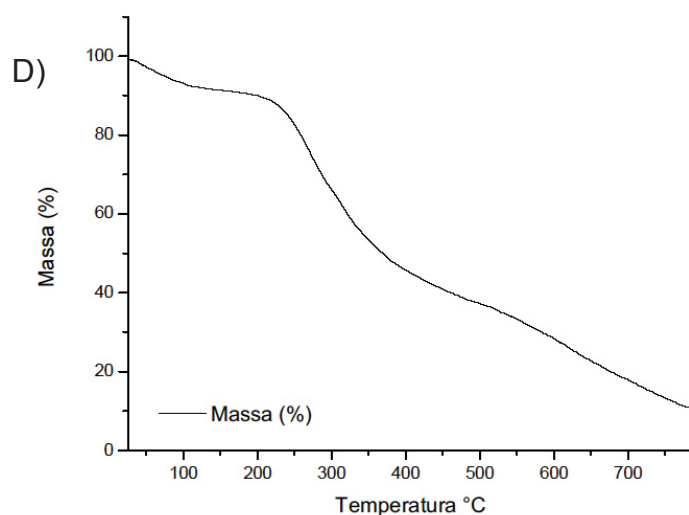
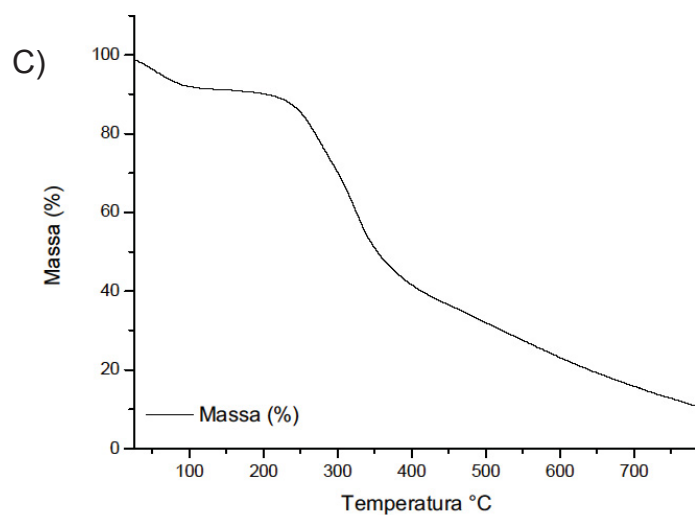
TABELA 10 - RESUMO DA PERDA DE MASSA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA *P. lutheri* E *P. gyrans*

Amostra	Umidade (%)	Matéria Volátil (%)	Matéria Não Degradada (%)
PLAQ-P	4,4	51,0	10,3
PLAQ-S	4,4	50,9	10,3
PLAQ-SE	5,4	71,8	13,1
PLAL-P	10,1	54,5	7,20
PLAL-S	8,7	51,4	20,1
PLAL-SE	6,9	57,0	20,3
PGAQ-P	9,6	57,9	6,5
PGAQ-S	7,6	51,4	10,8
PGAL-P	9,8	44,1	10,8
PGAL-S	9,8	46,9	11,1

As frações de *P. gyrans* também foram analisadas quanto ao perfil de degradação térmica. Foi observado que as frações aquosas, precipitadas e solúveis de tratamento de gelo-degelo, respectivamente (FIGURA 36 A e B), apresentaram curva de degradação bem acentuada, muito semelhante às observadas nas frações aquosas da microalga *P. lutheri* discutidas anteriormente. Verificou-se uma zona inicial de degradação referente à perda de umidade das frações que alcança aproximadamente 200 °C, sendo relacionado à 7,6 e 9,6 % de umidade nas frações PGAQ-P e PGAQ-S, respectivamente. Na sequência o evento correspondente a maior perda de massa ocorreu entre 200 e 400 °C e foi responsável pela degradação entre 51 e 57 % da massa das frações. O percentual de material não degradável em 800 °C variou entre 6,5 e 10,8, respectivamente.

FIGURA 36 - PERDA DE MASSA E TAXA DE PERDA DE MASSA DOS EXTRATOS OBTIDOS DE *P. gyrans*: PGAQ-P (A) PGAQ-S (B) PGAL-P (C) PGAL-S (D)





As frações alcalinas PGAL-P e PGAL-S apresentaram ampla faixa de degradação, entre 200 e 500 °C. A zona de perda de umidade atingiu aproximadamente 200 °C, e ambas as frações tiveram mesmo teor de umidade 9,8%, o teor de matéria volátil variou de 44,1 a 46,1 %, respectivamente e o teor de massa não degradada em 800 °C variou de 10,8 a 11,1 %. Baseado nas semelhanças entre as frações correspondentes das microalgas *P. gyrans* e *P. lutheri* e nas discussões dos resultados da análise de degradação térmica das frações de *P. lutheri*, conclui-se que o principal evento de degradação observado nas frações PGAQ-P e PGAQ-S, corresponde a queima das β -glucanas, enquanto nas frações

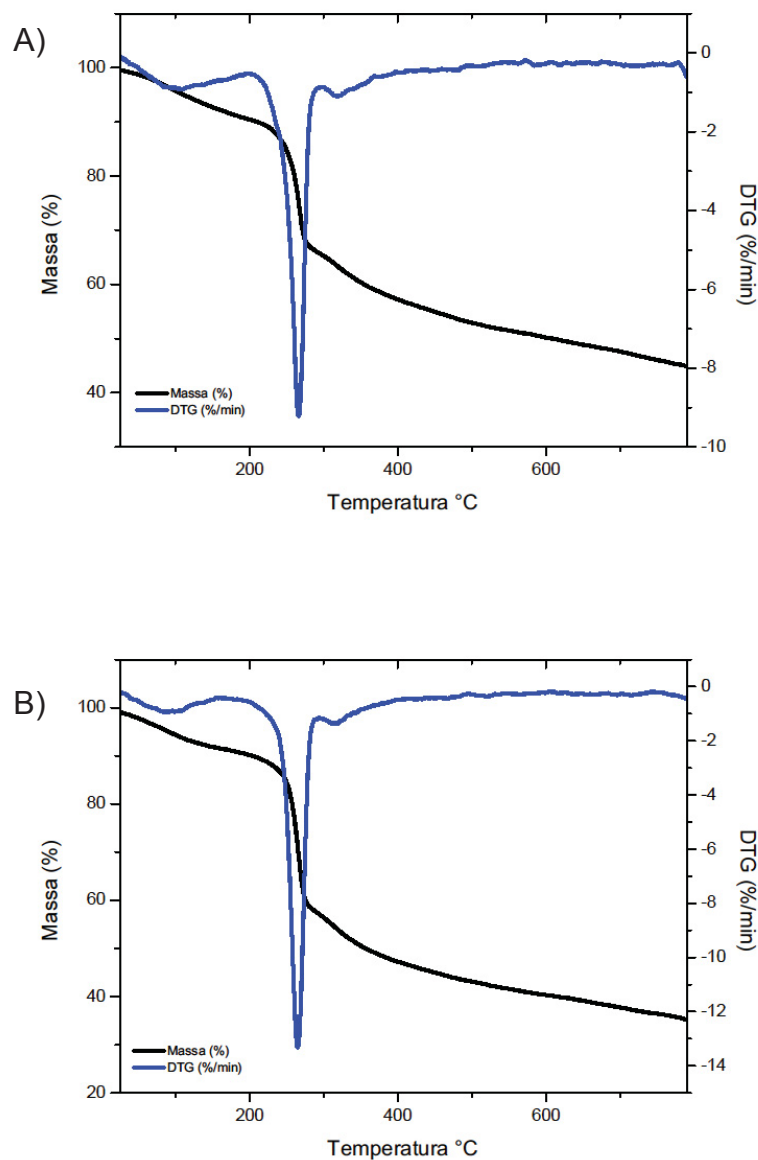
PGAL-P e PGAL-S o maior teor de proteínas degradado é concomitante com os carboidratos, promove uma ampliação na faixa de degradação.

MADDI *et al.* (2011) compararam termogramas de proteínas e amido e concluíram que existe pelo menos algum grau de sobreposição entre as temperaturas de degradação térmica destes polímeros. Além disso, esses autores também observaram que as características de degradação de polipeptídeos são específicas de cada tipo de proteína, dependendo de sua constituição a temperatura de queima e o percentual de massa não degradável remanescente.

POOJA e CHANDRA (2009) estudaram o perfil térmico da laminarana e observaram que a maior perda de massa, cerca de 50 %, ocorreu entre 250 e 320°C, com pico próximo aos 300 °C. Tais resultados estão de acordo com os observados nas análises termogravimétricas das frações aquosas, que indicaram picos de degradação em 276,4, 277,7 °C e 273,5°C para PLAQ-P, PLAQ-S e PLAQ-SE respectivamente. Essa ligeira diferença entre as amostras pode ser devido a diferenças estruturais nos polissacarídeos, como tamanho da cadeia e presença de ramificações. A degradação térmica de outras β -glucanas (1→4) e também (1→2)-ligadas também ocorre nessa mesma faixa de temperatura (GAZIT e KATZ, 2012; VENKATACHALAM *et al.*, 2014).

A biomassa das microalgas *P. gyrans* e *P. lutheri* também foi submetida a análise termogravimétrica (FIGURA 37 A e B, respectivamente). Observa-se que os termogramas são praticamente idênticos. Na primeira zona de degradação, até 200 °C, a perda de umidade atinge 9,6 % e 9,8 % para *P. gyrans* e *P. lutheri*, respectivamente. Observa-se curva de perda de massa bem acentuada entre 200 e 300 °C marcada pelo principal evento de degradação, com pico de temperatura em 267,4 °C para PG e 263,3 °C para PL, seguida de um evento com taxa de degradação bem inferior com pico em 316,8 °C e 314,4°C, respectivamente. A perda de massa nessa faixa atingiu 40,2 % e 44,4 %, respectivamente. O teor de material resistente a degração a 800 °C foi bem alto para ambas as microalgas, aproximadamente 45 % para PG e 35 % para PL.

FIGURA 37 - PERDA DE MASSA E TAXA DE PERDA DE MASSA DA BIOMASSA DAS MICROALGAS *P. gyrans* (PG) (A) E *P. lutheri* (PL) (B)



Baseado nas observações da análise termogravimétrica dos extratos obtidos da microalga *P. lutheri*, conclui-se que na biomassa de ambas as microalgas a degradação de carboidratos e proteínas é simultânea. Entretanto a maior perda de massa pode ser atribuída ao conteúdo de carboidratos com pico de temperatura variando entre 263 e 267 °C.

Com relação ao perfil de degradação térmica da biomassa de microalgas, está descrito que logo na sequência da faixa de temperatura em que ocorre a

desidratação, ocorre a fase de maior perda de massa na faixa entre 200 e 400 °C com picos de degradação em 280 °C (ALI *et al.*, 2015; LÓPEZ-GONZÁLES *et al.*, 2014) e 300 °C (KASSIM *et al.*, 2014; LÓPEZ-GONZÁLES *et al.*, 2014; AGRAWAL e CHAKRABORTY, 2013). Contudo, constata-se que para algumas espécies de microalgas esse estágio é dividido em duas zonas, sendo a primeira correspondente a degradação de polissacarídeos e proteínas solúveis e a segunda referente a decomposição de polissacarídeos insolúveis e lipídios (KASSIM *et al.*, 2014; AGRAWAL e CHAKRABORTY, 2013).

As microalgas com alto teor de lipídios também apresentam em seus termogramas uma curva referente a degradação térmica desta molécula. De acordo com estudos recentes, os lipídios decompõem-se numa faixa mais alta de temperatura que pode variar de 250 a 500 °C, onde os picos de decomposição são detectados entre 300 até 450 °C (KEBELMAN *et al.*, 2013; LÓPEZ-GONZÁLES *et al.*, 2014). Não foi possível observar picos de degradação nessa faixa de temperatura para nenhuma das microalgas estudadas neste trabalho.

As diferenças observadas podem ser atribuídas às diferenças no conteúdo e composição de carboidratos e proteínas (KASSIM *et al.*, 2014). O resíduo final de biomassa de microalga depois do processo de queima, as cinzas, é alto cerca de 20 a 40 % (KASSIM *et al.*, 2014; KEBELMAN *et al.*, 2013; LÓPEZ-GONZÁLES *et al.*, 2014).

5 CONCLUSÕES

Tanto a espécie *Pavlova gyrans* quanto *Pavlova lutheri* apresentam todas as fases do crescimento lag, log e estacionária ao decorrer de 14 dias. A fase lag é representada pelos dois primeiros dias, seguida da fase exponencial até o décimo dia, a partir do qual se observa a fase estacionária. Ao longo do crescimento também se verificam a flutuação na composição química da biomassa. O cultivo de ambas as espécies foi realizado até o 14º dia, fase em que foi observado o maior teor de carboidratos na biomassa, correspondendo à maior quantidade de biomassa.

As células foram cultivadas em frascos erlenmeyers de 2 L e a biomassa foi separada do meio de cultura por centrifugação, devido à praticidade no manejo das culturas.

Quanto à extração dos polissacarídeos de *P. gyrans* e *P. lutheri*, tanto as frações aquosas quanto alcalinas apresentaram alto teor de proteínas, embora as frações alcalinas tenham concentrado o maior percentual. Além disso, as frações aquosas foram as mais abundantes em carboidratos. As frações foram submetidas ao fracionamento por gelo-degelo que renderam frações precipitadas e solúveis em água fria. As análises espectroscópicas indicam que as frações aquosas de ambas as espécies são de maneira geral compostas por β -D-glucanas (1→3,6)-ligadas. Nas frações precipitadas concentram-se β -glucanas de baixo grau de ramificação, predominantemente lineares, enquanto nas frações solúveis em gelo-degelo concentram-se β -glucanas altamente ramificados.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. e CHAKRABORTY, S. A kinetic study of pyrolysis and combustion of microalgae *Chlorella vulgaris* using thermo-gravimetric analysis. **Bioresource Technology**. v. 128, p. 72-80, 2013.
- ALI, M.A.S. et al. Apparent kinetics of high temperature oxidative decomposition of microalgal biomass. **Bioresource Technology**. v. 175, p. 569-577, 2015.
- ASPINALL, G.O. **Polysaccharides**. Ed. Pergamon Press, Oxford. p, 228, 1970.
- ADAIR, E. et al. Variação da composição química do meio de cultura e da bioquímica celular de *Phaedodactylum tricornutum* (Bohlin), em cultivos estanques. **Boletim do Instituto Oceanográfico**. v. 39, n. 2, p. 131-139, 1991.
- AMARAL, A. E. et al. An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 3, p. 473-478, 2008.
- BAO, X. et al. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Carbohydrate Research**, v. 332, n. 1, p. 67-74, 2001.
- BECKER, A.G. **Utilização de organismos-alimento na larvicultura do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacia, Brachyura, Ocypodidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BENDIF, E. M. et al. Integrative Taxonomy of the Pavlovophyceae (Haptophyta): A Reassessment. **Protist**, v. 162, n. 5, p. 738-761, 2011.
- BLIGH, E.G. e DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1 \rightarrow 3)- β -d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1995.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W, GARLAND, C. D. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review. **CSIRO Marine Laboratories**, Hobart, 1989.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **J Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 145, p. 79-99. 1991.

BROWN, M. R. et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, n. 1-4, p. 315-331, 1997.

CARBONERO, E. R. et al. Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**. v. 90, p. 814-819, 2012.

CARBONERO, E. R. et al. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 252-257, 2006.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. **Mycological Research**, v. 111, n. 6, p. 635-652, 2007.

CHENGHUA, D. et al. A β -d-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 4, p. 629-633, 2000.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, A. Richmond, editor, Blackwell, Oxford, 2004, **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 7, p. 565-566, 2004.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHUAH, C. T.; SARKO, A.; DESLANDES, Y.; MARCHESSAULT, R. H. Triple-helical crystalline structure of curdlan and paramylon hydrates. **Macromolecules**. v. 16, p. 1375-1382, 1983.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**. v. 131, p. 209-217, 1984.

CLARKE, A. E. e STONE, B. A. Structure of the paramylon from *Euglena gracilis*. **Biochimica et biophysica acta**. v. 44, p. 161-163, 1960.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO Fisheries Technical paper, n. 361. Rome, FAO. 1996. 295p.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 2014/05/05 1956.

DVIR, I., STARK, H. A., CHAYOTH, R., MADAR, Z., ARAD, S. Hypocholesterolemic Effects of Nutraceuticals Produced from the Red Microalga *Porphyridium* sp in Rats. **Nutrients**. v. 1, p. 156-167, 2009.

DVIR, I., CHAYOTH, R., SOD-MORIAH, U., SHANY, S., NYSKA, A., STARK, H. A., MADAR, Z., ARAD, S. Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. **British Journal of Nutrition**. v. 84, p. 469-476, 2000.

EL-SAYDED, A. S. e MOSTAFA, M. E. Pyrolysis characteristics and kinetic parameters determination of biomass fuel of powders by differential thermal gravimetric analysis (TGA/DTG). **Energy Conversion and Management**. v. 85, p. 165-172, 2014.

EMDADI, D.; BERLAND, B. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Marine Chemistry**, v. 26, p. 215-225, 1989.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; PRADO, J.F.; REZIG, S.H. **Algas: uma abordagem filogenetica, taxonomica e ecologica**. 332p. Artmed, Porto Alegre, 2010.

GARG, S. et al. Flotation of marine microalgae: Effect of algal hydrophobicity. **Bioresource Technology**, v. 121, n. 0, p. 471-474, 2012.

GARDEVA, E., TOSHKOVA, R., MINKOVA, K., GIGOVA, L. Cancer protective action of polysaccharide, derived from red microalga *Porphyridium cruentum* – a biological background. **Biotechnol. & Biotechnol. Eq.** v. 23, p. 783-787, 2009.

GAZIT, M. O. e KATZ, A. Grafted Poly (1→4-β-glucan) strands on Silica: A comparative study of surface reactivity as a function of grafting density. **Langmuir**. v. 28, n. 1, p. 431-437, 2012.

GIDLEY, M. J.; NISHINARI, K.; STONE, A. B. B. F. A. Chapter 2.2 - Physico-chemistry of (1,3)-β-Glucans. In: (Ed.). **Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides**. San Diego: Academic Press, 2009. p.47-118. ISBN 978-0-12-373971-1.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, n. 1, p. 119-132, 1984.

GORIN, P. A. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 38, p. 13–104, 1981.

GRANUM, E.; MYKLESTAD, S. A simple combined method for determination of β-1,3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms. **Hydrobiologia**, v. 477, n. 1-3, p. 155-161, 2002.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006. >.

HOFFMAN, G. C. et al. Structure and Molecular size of Pachyman. **Carbohydrate Research**. v. 20, p. 185-188, 1971.

JANSON, P. –E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LONNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chemical Communications**, Estocolmo, v. 8, p. 1-71, 1976.

KANAGAWA, M.; SATOH, T.; IKEDA, A.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YAMAGUCHI, Y. Structural Insights into Recognition of Triple-helical β -Glucans by an Insect Fungal Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 286, n. 33, p. 29158–29165, 2011.

KASSIM, M. et al. Thermogravimetric analysis and kinetic characterization of lipid-extracted *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. **Algal Research**. v. 6, part A, p. 39-45, 2014.

KEBELMAN, K. et al. Intermediate pyrolysis and product identification by TGA and Py-GC/MS of green microalgae and their extracted protein and lipid components. **Biomass and Bioenergy**. v. 49, p. 38-48, 2013.

KULICKE, W.-M.; LETTAU, A. I.; THIELKING, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1 \rightarrow 3)- β -d-glucans. **Carbohydrate Research**, v. 297, n. 2, p. 135-143, 1997.

LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 219-225, 2010. ISSN 1043-6618.

LAZARIDOU, A. et al. Effect of oat and barley β -glucans on inhibition of cytokine-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells: Molecular structure–function relations. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 153-161, 2011.

LICHT, T. R.; EBERSBACH, T.; FRØKJÆR, H. Prebiotics for prevention of gut infections. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 2, p. 70-82, 2012.

LIU, C.P. e LIN, L.P. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. 207 **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. v. 42, p. 207-214, 2001.

LÓPEZ-GONZÁLES, D. et al. Kinetic analysis and thermal characterization of the microalgae combustion process by thermal analysis coupled to mass spectrometry. **Applied Energy**. v. 114, p. 227-237, 2014.

LOURENÇO, M S. O. et al. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis*. I. Comparison of two culture media. **Aquaculture**. v. 148, p. 153-168, 1997.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; LAVÍN, P. L.; MARQUEZ, U. M. L.; AIDAR, E.

Distribution of intracellular nitrogen in microalgae. Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, p. 17-32, 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos, SP: Rima Editora. 2006.

LOWRY, O. H. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MADDI, B. et al. Comparative study of pyrolysis of algal biomass from natural lake blooms with lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 23, p. 11018-11026, 2011.

MARCHESSAULT, R. H. e DESLANDES, Y. Fine structure of (1→3)-β-D-glucans: curdlan e paramylon. **Carbohydrate Research**. v.75, p. 231-242, 1979.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2009.

MATSUI, M. S., MUIZUDDIN, N., ARAD, S., MARENUS, K., Sulfated polysaccharides from red microalgae have anti-inflammatory properties *in vitro* and *in vivo*. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 104, p. 13-22, 2003.

MYKLESTAD, S. e HAUG, A. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 9, p. 125-136, 1972.

MINKOVA, K., MICHAÏLOV., Y., TONCHEVA-PANOVA, T., HOUBAVENSKA, N. Antiviral activity of *Porphyridium cruentum* polysaccharide. **Pharmazie**. v.51, p. 3-7, 1996.

NICHOLLS, K. H.; JOHN, D. W.; ROBERT, G. S. 13 - HAPTOPHYTE ALGAE. In: (Ed.). **Freshwater Algae of North America**. Burlington: Academic Press, 2003. p.511-521. ISBN 978-0-12-741550-5.

OKOBIRA, T. et al. Molecular Dynamics Studies of Side Chain Effect on the β -1,3-d-Glucan Triple Helix in Aqueous Solution. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 3, p. 783-788, 2008.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 459-466, 2003.

PAINTER, T. J. Algal Polisaccharides. In: ASPINALL, G. O. (Ed.). **The Polysaccharides**. Oxford, v.2, 1983. p.195-285.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2008.

PLAZA, M. et al. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 450-455, 2010. I

POOJA, K. P. e CHANDRA, T. S. Production and partial characterization of a novel capsular polysaccharide KP-EPS produced by *Paenibacillus pabuli* strain ATSKP. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 25, n. 5, p. 835-841, 2009.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 287-293, 2001.

QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 213-218, 2010.

REIREZ, M. J. F.; CAMACHO, A. P.; FERREIRO, M. J. BLANCO, J.; PLANAS, M.; CAMPOS, M. J.; LABARTA, U. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, v. 83, p. 17-37, 1989.

REIS, A. R. et al. A new pullulan and a branched (1→3)-, (1→6)-linked β -glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes favicans*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 210, p. 1-5, 2002.

RENAUD, S. M.; THINH, L.-V.; PARRY, D. L. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. **Aquaculture**, v. 170, n. 2, p. 147-159, 1999.

REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. Tradução: Iara Maria Franceschini. 280 p. Porto Alegre: Artmed, 2006.

RIJSSEL, M.V.; JANSEB, I.; NOORDKAMPB, D.J.B.; GIESKESA, W.W.C. An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*. **Journal of Sea Research** v. 43, p. 297–306, 2000.

RIZZI, J. **Potencial biotecnológico dos polissacarídeos de microalgas marinhas**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RODRÍGUEZ, J.A. D.A.; PALAU, L.C. e LÓPEZ, M.O.A. Extracción y Cuantificación de Lípidos. In: Vega, B.O.A e Voltolina, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. Baja California Sur, La Paz, México. 2007. p. 47-57.

RUTHES, A. C. et al. D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. **Carbohydrate Polymers**. v. 117, p. 753-761, 2015.

RUTHES, A. C. et al. *Lactarius rufus* (1→3),(1→6)- β -d-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**. v. 94, p. 129-136, 2013.

RUTHES, A. C. et al. Polysaccharides present in cultivated *Teloschistes flavicans* symbiosis: Comparison with those of the thallus. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 500-505, 2008. ISSN 0981-9428.

SALIM, S. et al. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 849-855, 2010.

SASSAKI, G. L. et al. Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. **Carbohydrate Polymers**. v. 104, p. 34–41, 2014.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**. v. 340, p. 731-739, 2005.

SEGUINEAU, C. et al. Vitamin requirements in great scallop larvae. **Aquaculture international**. v. 4, n. 4, p. 315-324, 1996.

SILVA, M.L.C da; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N.L.; SILVA, I.R.; VASCONCELOS, A.F.D.; CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**. v. 29, n.1, 85-92, 2006.

SILVEIRA, L.L.M. et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear β -D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Polymers*. v. 113, p. 588-596, 2014.

SILVERSTEIN, M. R.; WEBSTER, X. F.; KIEMLE, J. D. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda., 2010.

SLETMOEN, M.; STOKKE, B. T. Higher order structure of (1,3)- β -D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities. **Biopolymers**, v. 89, n. 4, p. 310-321, 2008. ISSN 1097-0282.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydrate Chemistry**. v. 6. p. 20-24, 1972.

SMIDERLE, F. R. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European Journal of Pharmacology**, v. 597, n. 1–3, p. 86-91, 2008. ISSN 0014-2999.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006. ISSN 1389-1723.

STONE, B. A.; STONE, A. B. B. F. A. Chapter 2.1 - Chemistry of β -Glucans. In: (Ed.). **Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides**. San Diego: Academic Press, 2009. p.5-46. ISBN 978-0-12-373971-1.

STORSETH, T.R.; HANSEN, K.; REITAN, K.I.; SKJERMO, J. Structural characterization of β -d-(1 \rightarrow 3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros mulleri* and *Thalassiosira weissflogii*. **Carbohydrate Research**. v. 340, n. 6, p. 1159-1164, 2005.

SUÁREZ, E. R. et al. Immunostimulatory Polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. A New Galactofuranan. Measurement of Molecular Weight and Molecular Weight Dispersion by DOSY NMR. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 8, p. 2368-2376, 2006/10/01 2006.

SUH, I. S.; LEE, C.G. Photobioreactor Engineering: Design and Performance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 313-321, 2003.

SYNYTSYA, A. et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 548-556, 2009.

TALYSHINSKY, M., SOUPRUN, Y., HULEIHEL, M. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. **Cancer Cell International**. v. 2, 2002.

VALENZUELA-ESPINOZA, E. et al. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquaculture engineering**. v. 25, n. 4, p. 207-216, 2002.

VANDAMME, D. et al. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology**. v. 31, n. 4, p. 233-239, 2013.

VARUM, K.M.; KHAM, B.J.; MYKLESTAD, S. Structure of a food-reserve β -D-glucan produced by the haptophyte alga *Emiliana huxleyi* (LOHMANN) Hay and Mohler. **Carbohydrate Research**. v. 152, p. 243-248, 1986.

VENKATACHALAM, G. et. al. Characterization and applications of cyclic β -(1,2)-glucan produced from *R. meliloti*. **Royal Society of Chemistry Advances**. v. 4, n. 22, p. 11393-11339, 2014.

VIDOTTI, C. E.; ROLLEMBERG, M. D. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VOLMAN, J. J. et al. Dietary (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glucans from oat activate nuclear factor- κ B in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. **Nutrition Research**, v. 30, n. 1, p. 40-48, 2010.

YOSHIOKA, Y. et al. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) quel.: Isolation and structure of a β -glucan. **Carbohydrate Research**, v. 140, n. 1, p. 93-100, 1985.

YOUNG, S.-H.; DONG, W.-J.; JACOBS, R. R. Observation of a Partially Opened Triple-helix Conformation in 1 \rightarrow 3- β -Glucan by Fluorescence Resonance Energy Transfer Spectroscopy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11874-11879, 2000.

'T LAM, G. P. et al. Cationic polymers for successful flocculation of marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 169, n. 0, p. 804-807, 2014.

YONEDA, N.T. **Plâncton**. Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná. Pontal do Paraná, PR. 29 p. 1999.

CAPÍTULO 2: CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS A
***Salmonella enterica* sv. Typhimurium**

1 INTRODUÇÃO

Salmonella typhimurium é uma das causas mais frequentes de gastroenterites em humanos (FABREGA e VILA 2013; BAUMLER *et al.*, 1996), principalmente devido ao fato de que ao infectar animais tipicamente criados na pecuária como suínos, bovinos e aves estas bactérias apresentam habilidade de colonizá-los sem produzir sintomas clínicos (ALTHOUSE *et al.*, 2003). Dessa maneira, os animais são na grande maioria das vezes o foco de contaminação em humanos, além da água e vegetais.

De acordo com dados da Secretária de Vigilância em Saúde (SVS, 2014), a salmonelose esteve associada a aproximadamente 40 % dos casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil entre 2000 e 2013. Dentre outros microrganismos, é a primeira causa de infecção, o que remete à grande problema de saúde pública. Por este motivo, existe interesse por parte das indústrias alimentícias e médica de desenvolver métodos de defesa contra estas doenças (GANNER *et al.*, 2010).

De maneira geral, o controle das infecções em animais é feito pela administração de antibióticos, entretanto essa prática leva à geração de bactérias resistentes (PATON *et al.*, 2006; BOROWSKY, 2009; FERKET, 2011; SHARON e OFEK, 2000; SPRING e PRIVULESCU, 2012; HAJATI e REZAEI, 2010). Este fato é prejudicial, pois a minoria de células capazes de resistir ao tratamento cresce e rapidamente torna-se dominante, não sendo sensível ao tratamento (RASKO e SPERANDIO, 2010).

Para a maioria dos patógenos, o reconhecimento e a adesão às células do hospedeiro são essenciais para iniciar a colonização e causar a doença (RASKO e SPERANDIO, 2010). A aderência é mediada pela expressão de adesinas, tais como as lectinas, presentes em estruturas conhecidas como fimbrias ou na própria superfície das bactérias. Essas adesinas reconhecem receptores específicos na membrana celular do hospedeiro, sendo que um dos mecanismos de interação mais bem conhecido é a ligação entre as lectinas das bactérias e carboidratos, presentes nos receptores celulares (OFEK *et al.*, 2003).

O mecanismo de reconhecimento descrito anteriormente é a base para novas estratégias no combate as infecções (sem uso de antibióticos), por meio do uso de receptores análogos, ou seja, moléculas de carboidratos que se assemelham à estrutura dos receptores, podendo ser reconhecidas pelas adesinas presentes nas bactérias. Sem se ligar aos enterócitos, essas bactérias são incapazes de colonizar o intestino de animais e são expelidas do intestino (OFEK *et al.*, 2003).

Este trabalho tem como objetivo avaliar os extratos obtidos a partir das microalgas marinhas *P. gyrans* e *P. lutheri* quanto à capacidade de ligação à bactéria patogênica *Salmonella typhimurium*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAPACIDADE DE LIGAÇÃO A PATÓGENOS

Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de conhecer novas moléculas que tenham a capacidade de adsorver enterobactérias patogênicas, entre elas com polissacarídeos sulfatados de microalgas, derivados pécticos, extratos da parede celular de *Trichosporon mycotoxinivorans*, colostro bovino, além de algumas cepas de *Lactobacillus* (GUZMAN-MURILLO e ASCENCIO, 2000; GANNER *et al.*, 2010; NEESER *et al.*, 2000; NAKAZATO *et al.*, 2011; EBERSBACH *et al.*, 2012; QUINTERO-VILLEGAS *et al.*, 2013).

Atualmente, já estão disponíveis no mercado alternativas para a profilaxia de infecções entéricas em animais (comumente tratadas com antibióticos após instalação da infecção). Grande parte dos produtos são obtidos a partir da parede celular de levedura, que consiste numa mistura de β -glucanas e manoproteínas (SPEARMAN, 2004; KLIS *et al.*, 2006; KOGAN e KOCHER, 2007). Estas moléculas têm sido descritas pela sua capacidade imunomoduladora e de adsorção bacteriana, respectivamente.

A capacidade desses produtos em aumentar a resistência do animal à infecções entéricas é dada, então, pelo bloqueio da adesão bacteriana, inibindo, assim, a colonização por bactérias entéricas patogênicas, além de aumentar a imunidade do animal (BOHN e BeMILLER, 1995; KOGAN e KOCHER, 2007; BUSSIÉRE, 2010; OFEK *et al.*, 2003; MORAN, 2011; FERKET, 2011; SPRING e PRIVULESCU, 2012).

2.1.2 Mecanismo de adsorção de enterobactérias

Pesquisas têm sido realizadas a fim de esclarecer como as bactérias se aderem à superfície celular. A utilização de polissacarídeos, como agentes anti-adesivos, pode ser fundamental no desenvolvimento destes produtos, visto que tais moléculas apresentam as características desejáveis: não são mutagênicas, apresentam baixa ou nenhuma citotoxicidade e são biodisponíveis (BEACHEY,

1981; OFEK *et al.*, 2003). O fato de microalgas serem fontes baratas e rapidamente cultiváveis é um importante fator econômico na busca por estes compostos.

Cabe destacar que informações sobre polissacarídeos e suas fontes de obtenção, acessibilidade, concentração e possíveis estruturas dos receptores para adesão bacteriana ainda não estão explícitas. Mais estudos são necessários para elucidar tais informações (BECKER e GALLETTI, 2008).

2.1.3 Processo de adesão

Adesão de patógenos à superfície do epitélio do intestino (colonização bacteriana) é a primeira etapa crítica do processo de infecção. Este processo é mediado por fatores de aderência microbiana chamados de adesinas. Essas adesinas podem ser proteínas ou glicoproteínas. (OFEK *et al.*, 1977; LINDHORST *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 2002; OFEK *et al.*, 2003; MORAN, 2011).

Existem três tipos principais de interações adesinas-receptor: lectinas-carboidratos – envolve a ligação de proteínas que reconhecem especificamente carboidratos (lectinas), e estão presentes na superfície das bactérias patogênicas, mais especificamente nas fímbrias ou na superfície da célula hospedeira; proteínas-proteínas - envolve o reconhecimento entre proteínas bacterianas e proteínas complementares localizadas na superfície da mucosa e hidrofobinas-proteínas - caracterizado pela interação entre proteínas e lipídeos (OFEK *et al.*, 2003; LINDHORST *et al.*, 1998).

As interações lectinas-carboidratos estão difundidas na maioria dos patógenos e possuem papel crucial no desenvolvimento do processo-doença, por isso tem sido extensivamente estudadas (LINDHORST *et al.*, 1998; OFEK *et al.*, 2003). As lectinas, em bactérias gram negativas, estão localizadas nas fímbrias, sendo capazes de reconhecer e se ligar à carboidratos complementares disponíveis sobre a superfície do tecido gastro-intestinal do hospedeiro, iniciando, desta forma o processo de adesão bacteriana (LINDHORST *et al.*, 1998; MORAN, 2011).

2.1.3.1 Fímbrias

As fímbrias são filamentos de proteínas que se projetam da superfície da bactéria e possuem lectinas capazes de ligar-se a receptores específicos na mucosa do hospedeiro. As fímbrias são classificadas de acordo com as lectinas presentes e, conseqüentemente, com a especificidade aos carboidratos. As lectinas mais conhecidas são as manose-sensíveis. Essas lectinas são codificadas pelo gene *fimH*, por isso, muitas vezes também são chamadas *fimH*, ou ainda MBP (proteínas ligadoras de manose), e têm a sua aglutinação com eritrócitos inibida pela manose. Outras fímbrias podem apresentar característica manose-resistentes, que não apresentam hemaglutinação inibida pela manose (SWENSON e CLEGG, 1992; QUADRI *et al.*, 1994; LINDHORST; *et al.*, 1998; FABREGA e VILA, 2013).

As enterobactérias possuem, de modo geral, fímbrias do tipo I, onde há lectinas manose específicas. Essas lectinas reconhecem glicoproteínas, com elevado teor de manose, localizadas sobre a superfície intestinal (LINDHORST *et al.*, 1998; SPRING *et al.*, 2000; SPEARMAN, 2004; OFEK *et al.*, 2003).

A patogênese de infecções por *Salmonella enterica* requer adesão à várias superfícies celulares do hospedeiro, e um largo número de estruturas adesivas podem ser encontradas. Dependendo do sorovar, genes para vários tipos de adesinas fimbriais são identificadas (WAGNER e HENSEL, 2011).

Para a *S. enterica* sorovar *typhimurium* são descritos os óperons: *Pef* (*plasmid encoded fimbriae*), que está envolvido na ligação ao epitélio intestinal, o *Fim* que codifica a fímbria tipo I, e recentemente foi descrito o gene *Tafi* (*thin aggregative fimbriae*), envolvido na síntese de um fino agregado de fímbrias denominado “*curli*” (ASTEN e DIJK, 2005; BOROWSKI, 2008; FRONZES *et al.*, 2008; WAGNER e HENSEL, 2011). Algumas adesinas também são capazes de ligar proteínas, de acordo com DORSEY *et al.* (2005) ShdA e MisL são capazes de ligar fibronectina. Outros genes que codificam adesinas fimbriais também já foram descritos para *S. typhimurium*, entretanto não há muita informação a respeito da especificidade de ligação dessas adesinas (FABREGA e VILA, 2013; YUE *et al.*, 2012). Estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de desvendar as propriedades destas moléculas e os fatores determinantes para virulência de *Salmonella* (WAGNER e HENSEL, 2011).

Foram descritos até então diversos tipos diferentes de fímbrias para *S. typhimurium*, porém, somente as fímbrias do tipo 1 apresentam o mecanismo mais conhecido. Esta fimbria é composta por duas subunidades protéicas denominadas FimA e FimH, sendo que esta última é determinante para ligação ao epitélio. FimH está localizada nas laterais e extremidades das fímbrias e é altamente específica para resíduos de manose, entretanto alguns estudos já relacionam a ligação dessa lectina a outros carboidratos como glucose, porém, com menor afinidade (SOKURENKO *et al.*, 1995; LINDHORST *et al.*, 1998; WEISSMAN *et al.*, 2003; GRZYMAJTO *et al.*, 2010; WAGNER e HENSEL, 2011; BOROWSKI, 2008, FRONZES *et al.*, 2008; MORAN 2011; JONES *et al.*, 1995; LEE e LEE, 2000; QUESENBERRY *et al.*, 1997; BOUCKAERT *et al.*, 2005)

2.1.4 Mecanismo anti-adesão

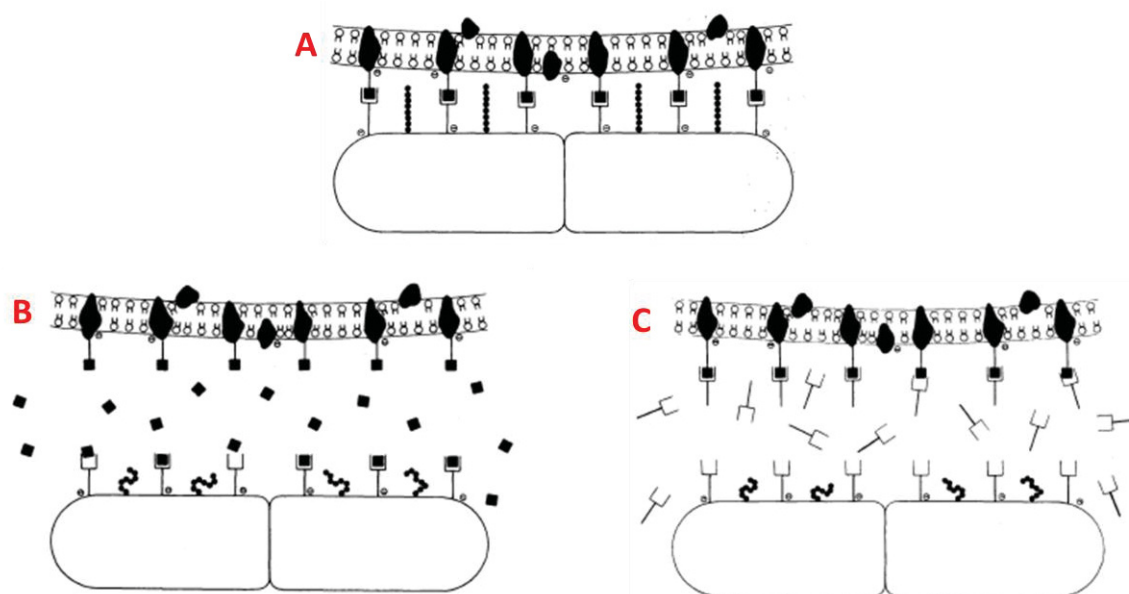
O uso de moléculas que são capazes de bloquear a adesão bacteriana representam uma estratégia ideal para combater a patogênese bacteriana. Esse fato se deve à sua importância no início do processo infeccioso, como medida profilática, impedindo a colonização de patógenos no intestino humano (BECKER *et al.*, 2007; GANNER *et al.*, 2010).

A profilaxia com agentes anti-adesivos, no entanto, pode não ser tão eficaz, visto que os patógenos expressam, na sua maioria, vários genes codificadores de diferentes adesinas, de modo que as bactérias podem apresentar mais de uma via de adesão à mucosa. Além disso, o processo de adesão pode ocorrer por interações hidrofóbicas, ou interações não específicas com as células do hospedeiro. Para a terapia anti-adesão ser completamente efetiva, é necessário o uso de múltiplos agentes, que inibam especificamente cada tipo de adesina do patógeno infectante ou um simples agente com amplo espectro de atividade anti-adesão (BECKER e GALLETTI, 2008). Entretanto, justamente devido ao grande número de possibilidades envolvidas no processo de adesão, o mecanismo anti-adesão não está totalmente elucidado, existindo algumas teorias descritas (FIGURA 38 B e C). Entre elas, a mais difundida é evidenciada com o uso de receptores análogos, onde a *Salmonella* sp, por exemplo, através das lectinas localizadas nas fímbrias, se ligará a carboidratos contendo manose (fenômeno de adsorção) devido a sua alta

disponibilidade e concentração, evitando, consequentemente, o processo de adesão e infecção (FIGURA 38 B) (OFEK *et al.*, 1977; MORAN, 2011). A bactéria ligada ao material com elevado teor de manose será então eliminada do intestino junto com as fezes (FIRON *et al.*, 1987; MORAN, 2011; SPRING e PRIVULESCU, 2012; HAJATI e REZAEI, 2010).

Outro mecanismo a respeito das terapias anti-adesão é baseado no uso de adesinas análogas (FIGURA 38). Essas proteínas isoladas se ligam aos receptores e, competitivamente, bloqueiam a adesão bacteriana (OFEK *et al.*, 2003). No entanto, o uso de análogos de adesinas pode se tornar problemático, pois são macromoléculas que não estão prontamente disponíveis, além de ser necessário empregá-las em altas concentrações. Além disso, uma cuidadosa consideração deve ser dada a sua toxicidade e imunogenicidade (BEACHEY, 1981; OFEK *et al.*, 2003).

FIGURA 38 - MECANISMOS ANTI-ADESÃO



NOTA: Y: ADESINA (lectinas). ■: CARBOIDRATOS. A) Mecanismo normal de adesão: as adesinas da bactéria reconhecem carboidratos na superfície da mucosa o que resulta em adesão. B) Uso de receptores análogos (p.e. manooligossacarídeos - mos): Os receptores análogos se ligam nas lectinas da bactéria impedindo a adesão. C) Uso de adesinas análogas: as adesinas análogas reconhecem os carboidratos na superfície da mucosa e se ligam impedindo a adesão.

FONTE: adaptado de BEACHEY (1981)

3 Paper: Marine Microalgae Extracts and their Binding Capacity to *Salmonella enterica* sv Typhimurium

Abstract

Salmonella enterica sv. Typhimurium is one of the main causes of gastroenteritis in humans. The first step of infection involves adhesins present in the fimbriae of bacteria, which recognize and bind to receptors on the surface of the host cell. One of the accepted adhesion mechanism is related with type 1-fimbriae that bind mannose residues. Therefore, some molecules, with diverse chemical structures, have been tested as analog receptors due to their capacity to bind bacteria and prevent cell adhesion. The aim of this study was to investigate the binding capacity of aqueous extracts from the marine microalgae *Pavlova gyrams* and *P. lutheri* to the pathogenic gram-negative bacteria *S. typhimurium*. To evaluate the binding capacity of microalgae extracts, growth parameters, optical densities, detection times of growth and colony count of *S. typhimurium* were determined. It was observed that the fractions that exhibited highest binding capacity were those obtained from *P. gyrams* extracts. These fractions had similar activities when compared with a commercial product (positive control) used in the feedstock industry to control zoonosis. The fractions consisted of proteins and carbohydrate with heterogeneous monosaccharide composition and β -glucans that could synergistically work to bind bacteria via type 1, mannose-specific fimbriae and/or other mechanisms still unknown. Therefore, these species of microalgae possess a high potential to serve as an alternative source of anti-adhesive compounds.

Keywords Microalgae. Glucans. Binding capacity. Enterobacteria. Gut health.

Introduction

Microalgae are microorganisms capable of producing a wide variety of biomolecules, according to the division or class to which they belong (PLAZA *et al.*, 2008). Phylum Haptophyta comprises two classes, Prymnesiophyceae and Pavlovophyceae (BENDIF *et al.*, 2011; NICHOLLS *et al.*, 2003), the latter includes the two marine species under study *Pavlova lutheri* and *P. gyrans*. Because they can be rapidly and easily cultured, these species as well as some other microalgae are extensively used as feedstock in the aquaculture of fish and crustaceans (BOROWITZKA 1999; PONIS *et al.*, 2006; PONIS *et al.*, 2008). These favorable culturing conditions mean that these species can be cultured at a large scale as source of bioactive compounds with industrial applications (PLAZA *et al.*, 2008).

Polysaccharides and oligosaccharides from different sources have widely diverse chemical structures and are known to have multiple biological activities (MANTOVANI *et al.*, 2008). Researches show that carbohydrates have capability to inhibit the adhesion of enteropathogens (e.g., *Salmonella*, *Clostridium* and *Escherichia* spp.) to the host tissue (SHOAF *et al.*, 2006; MALDONADO-GOMEZ *et al.*, 2015; QUINTERO-VILLEGAS *et al.*, 2013).

Enteric infections are considered public health concerns. These infections occur by ingestion of broiler, beef and swine infected meat. Thus, control of transmission by the food chain and protection of livestock against diseases and infections are of paramount importance. Currently, the infected animals control is carried out with antibiotics; however, bacteria can become antibiotic resistant, which leads to treatment failure (PATON *et al.*, 2006).

The first step in the bacterial infection process is the adhesion of bacteria to host cells surface in the intestinal tract. Adhesion is generally mediated via lectin-like adhesins expressed by the bacteria that recognize and adhere to ligand-like carbohydrates located on the surface of host epithelial cells (BURGER *et al.*, 2000; QUINTERO *et al.*, 2011). It was suggested that some carbohydrates are able to avoid enteric infections inhibiting the adhesion of enteropathogens to the intestine, acting as ligands and participating in the binding with specific bacterial lectins (OFEK *et al.*, 2003). Therefore, strategies using anti-adhesion agents can be effective reducing infections, disease and the risk of transmission (BECKER *et al.*, 2007).

Commercial products with anti-adhesive properties derived from yeast cell walls containing mannan-oligosaccharides (MOS), are already employed in animal feed to bind pathogens (BECKER *et al.*, 2007; PATON *et al.*, 2006; KOGAN and KOCHER 2007). Enterobacteria, such as *Escherichia* or *Salmonella* spp., present mannose-specific (type 1) lectins in their fimbriae (FIRON *et al.*, 1987; NEESER *et al.*, 1986), this structural characteristic explains the effectiveness of products based on yeast cell wall extracts. In addition to MOS, structurally diverse carbohydrates have been investigated for their ability to inhibit bacterial adhesion, as galacto-oligosaccharides, xylo-oligosaccharides, chito-oligosaccharides, among others (MARTÍN-SOSA *et al.*, 2002; EBERSBACH *et al.*, 2012; QUINTERO-VILLEGAS *et al.*, 2013).

Few studies examining the anti-adhesive properties of polysaccharides derived from microalgae are available in literature. GUZMAN-MURILLO and ASCENCIO (2000) reported that exopolysaccharides from *Tetraselmis* spp., *Neochloris oleoabundans* and *Phaeodactylum tricornutum* caused 50 % inhibition of adhesion of *Helicobacter pylori* to the HeLa S3 cells. According to LOKE *et al.* (2007) polysaccharides obtained from *Spirulina* are capable of binding mucin-binding proteins of *H. pylori* preventing adhesion of bacteria to the gastric mucin.

The aim of this study was to obtain polysaccharides-containing extracts from microalgae *P. lutheri* and *P. gyrans*, and investigate, *in vitro*, their binding capacity to the enterobacteria *Salmonella enterica* sv. Typhimurium.

Materials and Methods

Microalgae

The Haptophyta species *Pavlova gyrans* (kindly gift by the Elizabeth Aidar Microalgae Culture Collection, Fluminense Federal University, Rio de Janeiro, Brazil) and *P. lutheri* (LB 992, UTEX, University of Texas, Austin, USA) were cultivated in Guillard f/2 culture medium (GUILLARD, 1975). The culture medium was prepared using seawater or distilled water with added sea salt (30 g.L⁻¹) that was previously filtered and sterilized at 121 °C during 15 min. Microalgae growth was performed at 18-20 °C under constant light. After fourteen days, the cells were removed by

centrifugation at $10,000 \times g$ (Himac CR 21E, Hitachi Koki Co., Tokyo, Japan), for 20 min at 4 °C and the pellet was lyophilized to obtain the dry biomass (0.4 g.L^{-1} and 0.7 g.L^{-1} yield for *P. gyrans* and *P. lutheri*, respectively).

Microalgae extractions

The sequential extractions performed were the same for both microalgae species. The dry biomass was submitted to aqueous extraction (20 g.L^{-1}) under magnetic stirring at 80 °C for 2 h (2x) and then to alkaline extraction (20 g.L^{-1}) with 0.5 M sodium hydroxide and sodium borohydrate (5 % w/w) at 80 °C for 2 h. After each extraction, the residue was removed by centrifugation (15 min, $10,000 \times g$), and submitted to the next extraction. The aqueous supernatants from the first and second extractions were combined, concentrated, submitted to ethanol precipitation (3 vol.) and maintained at 4 °C overnight. The precipitate, obtained by centrifugation (15 min, $10,000 \times g$), was dissolved in water, submitted to fractionation by freeze-thawing and dialyzed (Spectra/Por Dialysis Membrane, cut-off 12-14 kDa, Spectrum Laboratories Inc., Los Angeles, USA) against distilled water before freeze-drying, resulting in soluble fractions, GW-s and LW-s, and insoluble fractions, GW-p and LW-p. The alkaline supernatant was neutralized (0.5 M hydrochloric acid), concentrated, submitted to ethanol precipitation (3 vol.) and maintained at 4 °C overnight. The precipitate was dissolved in water, submitted to fractionation by freeze-thawing and dialyzed (cut-off 12-14 kDa) before freeze-drying, yielding soluble fractions, GA-s and LA-s, and insoluble fractions, GA-p and LA-p. G, L, W and A corresponds to *P. gyrans* and *P. lutheri*, aqueous and alkaline extracts, respectively.

Characterization of microalgae extracts

General Method

The total carbohydrate content was analyzed by the phenol- H_2SO_4 method using glucose as standard (DUBOIS *et al.*, 1956). The protein content was estimated by the method of LOWRY *et al.* (1951).

Monosaccharide composition

To determine the monosaccharide composition, fractions were hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid for 2 h at 100 °C, followed by sodium borohydrate reduction and acetylation with acetic anhydride for 1 h at 120 °C. The resulting alditol acetates were analyzed by GC-MS and identified by typical electron-impact breakdown profiles and retention times (JANSSON *et al.*, 1976). GC-MS analyses were performed using a Varian 3800 chromatograph (Varian, Walnut Creek, USA) connected to a Varian Saturn 2000R ion-trap spectrometer using He as carrier gas at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. A DB-225 capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., J&W, Santa Clara, USA) was used, applying a linear temperature gradient from 50 to 215 °C at a rate of 40 °C.min⁻¹ for the quantitative analysis of alditol acetates and partially O-methylated alditol acetates.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

NMR spectroscopic analyses were performed using a Bruker AVANCE™ III 400 NMR spectrometer (Bruker BioSpin Corporation, Rheinstetten, Germany) equipped with a 5-mm inverse probe at 70 °C. The base frequency was 400.13 MHz for ¹H and 100.63 MHz for ¹³C nuclei. For the ¹³C NMR spectra, the samples were dissolved at a concentration of 40–50 mg.mL⁻¹. For the ¹H and 2D NMR experiments, and then dissolved in deuterated dimethyl sulfoxide (Me₂SO-d₆) (20–25 mg.mL⁻¹). Chemical shifts were expressed as δ and spectra calibrated using the resonances of CH₃ groups of Me₂SO-d₆ (¹H at δ 2.40; ¹³C, δ 39.7). The ¹H, ¹³C, and ¹³C-DEPT acquisition parameters were previously reported (ASCÊNCIO *et al.*, 2006). 2D ¹H/¹³C HSQC experiments were performed using the pulse programs supplied with the Bruker manual.

Adhesion test

Bacteria

Salmonella enterica sv. Typhimurium ATCC 14028 was maintained at 4 °C in Agar Brain Heart Infusion (BHI, M211, Himedia, Brazil) and subcultured at 15-day intervals. To prepare the inoculum used for the adhesion test, the cells were transferred to Tryptic Soy Broth (TSB, M011, Himedia), incubated overnight at 37 °C under aerobic conditions, transferred to fresh medium and grown for 2 h. Bacterial suspensions with an optical density at 690 nm (OD₆₉₀) of 0.1 were prepared in PBS (phosphate-buffered saline: 10 mmol.L⁻¹ sodium phosphate and 0.15 mol.L⁻¹ sodium chloride, pH 7.0) and diluted to OD₆₉₀ of 0.01.

Principle

A microplate method modified from BECKER *et al.* (2007) and GANNER *et al.* (2010) was used to determine the adhesion of *S. typhimurium* on microalgae extracts by measuring the optical density of the culture solutions to indicate growth of the adhering bacteria. The growth rate is related to the number of bound bacteria. The more bound bacteria, the quicker the growth, and the earlier the exponential phase is reached, thus indicating high adherence capacity of the tested sample.

Assay

The microalgae extracts were suspended in PBS (1 % w/v) and subsequently, were sonicated three times for 30 s each (coating solution). A total of 300 µL per well of the coating solution was pipetted into flat-bottom wells of high-binding polystyrene microtitration plates (Costar – Corning incorporated, New York, USA). Plates with coating solution were incubated overnight at 4 °C. The plates were washed, three times, with 300 µL of PBS to remove unbound material. Then, to prevent potential non-specific binding, spaces not occupied by the coating solution molecules were blocked by addition of bovine serum albumin (BSA, A7906, Sigma-

Aldrich, USA). For this the plates were incubated with 300 µL per well of 1 % BSA in PBS (w/v) at 4 °C for 1 h. The plates were then washed, three times, with 300 µL of PBS.

Previously prepared bacteria at an OD₆₉₀ of 0.01 were added (200 µL) to the microtitration plate wells. Bacteria were allowed to adhere for 1 h at 37 °C. Then, the wells were washed six times, with 300 µL of PBS, to remove non-adherent bacteria. Finally the wells were filled with 200 µL of TSB and coated with one drop of paraffin-oil to avoid dehydration. The microplate was placed in a microplate reader (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA), where it was incubated at 37 °C for 18 h. The OD₆₉₀ was determined at 15-min intervals and shaken at medium intensity for 3 s prior to every reading. All readings were performed in triplicate per microplate and in three independent assays.

Blank wells, growth controls, negative controls, positive controls and media controls were also assessed. The blank control consisted of the microalgae fractions and BSA but no test bacteria; the negative control (define as binding control by GANNER *et al.*, 2010) consisted of BSA and test bacteria but the microalgae extracts were not added to evaluate non-specific binding; the growth control was a BSA-blocked well containing a suspension of bacteria in TSB. For this control bacteria were not submitted to the washing step; for the positive control a commercially available yeast cell wall product was used, and compared with the microalgae extracts activity.

Growth Parameters

The data analysis followed the model previously described by GROOT *et al.* (1996) adapted by BECKER *et al.* (2007). The sigmoidal equation (1) was adopted to describe the kinetics of bacterial growth. This equation has three important variables (A, B and C) that can be obtained from the growth curve. Derivative equations allow obtaining growth parameters secondaries (t_{pi} , t_{det} , $t_{OD=0.1}$). All these parameters were used to evaluate the bacterial growth and to estimate the microalgae extracts adherence capacity to *S. typhimurium*.

$$f_{OD}(t) = \frac{A}{1 + \frac{B^C}{t^C}} \quad (1)$$

In order to compare the number of adhered bacteria between different fractions, a linear regression was compiled by plotting the CFU.mL⁻¹ against the detection time, in hours, when serial dilutions of bacterial reached an optical density of 0.1 at 690 nm (GANNER *et al.*, 2010). Using linear regression, the unknown amount of bound bacteria was calculated for each microalgae fraction.

Data processing and statistics

The OD data were processed by nonlinear regression analysis using eqn (1) as previously described by BECKER *et al.* (2007). The parameters therefore obtained (A, B, and C) were employed to calculate t_{pi} , t_{det} and $t_{OD=0.1}$.

All parameters thus obtained (A, B, C, t_{pi} , t_{det} and $t_{OD=0.1}$) were statistically analyzed using the program R (Version 2.15.1; The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) applied analysis of variance (ANOVA) and differences between mean values were tested using Tukey's test ($P \leq 0.05$). The graphics were created using GraphPad Prism (Version 5.03, GraphPad Software, San Diego, USA).

Results

The study found that *P. gyrans* extracts generally showed higher binding capacity than *P. lutheri* extracts. The alkaline fractions GA-s, GA-p and LA-s and aqueous fractions GW-p and LW-p bound similarly to the positive control and significantly more than negative control. The differences for the $t_{OD=0.1}$ parameter between the faster fractions tested and negative control were as follows: LA-s 0.94 h, GA-s 0.9 h, positive control 0.84 h, GW-p 0.81 h, GA-p 0.59 h, and LW-p 0.47 h (TABLE 11). Quantitative adhesion between the bacteria and microalgae extracts was determined by measuring the growth of adherent bacteria using the OD. The growth rate depended on the number of adhering bacteria – a higher number bound bacteria results in an earlier entry into the exponential phase.

TABLE 11 - GROWTH PARAMETERS OF *Salmonella enterica* SV. TYPHIMURIUM ATCC 14028 IN MICROTITRATION PLATES COATED WITH MICROALGAE EXTRACTS

Samples tested*	A (OD)	B (h)	C	t_{pi} (h)	t_{det} (h)	$t_{OD=0.1}$ (h)	Amount of bound bacteria: CFU/3 mg
LA-s	0.65 (0.01) ^B	7.53 (0.23) ^B	13.48 (1.02) ^{A-B}	7.44 (0.23) ^B	6.21 (0.23) ^{B-C}	6.63 (0.24) ^B	9 x 10 ²
GA-s	0.56 (0.08) ^A	7.48 (0.21) ^B	13.19 (1.03) ^{A-B}	7.39 (0.21) ^B	6.13 (0.25) ^{B-C}	6.67 (0.25) ^{B-C}	8 x 10 ²
Positive Control	0.60 (0.06) ^{A-B}	7.59 (0.34) ^{B-C}	13.30 (0.74) ^{A-B}	7.51 (0.34) ^{B-C}	6.24 (0.31) ^{B-C}	6.73 (0.37) ^{B-C}	7 x 10 ²
GW-p	0.54 (0.08) ^A	7.69 (0.52) ^{B-C}	11.98 (3.04) ^B	7.56 (0.59) ^{B-C}	6.07 (0.91) ^C	6.76 (0.65) ^{B-C}	7 x 10 ²
GA-p	0.55 (0.09) ^A	7.82 (0.12) ^{B-C}	13.22 (1.05) ^{A-B}	7.73 (0.12) ^{B-C}	6.41 (0.18) ^{B-C}	6.98 (0.14) ^{B-C}	5 x 10 ²
LW-p	0.58 (0.06) ^{A-B}	7.99 (0.25) ^{A, C}	13.38 (1.64) ^{A-B}	7.90 (0.26) ^{C-D}	6.55 (0.37) ^{A-C}	7.10 (0.26) ^B	4 x 10 ²
LA-p	0.59 (0.08) ^{A-B}	7.98 (0.16) ^C	14.07 (1.18) ^A	7.89 (0.16) ^{A, C}	6.63 (0.22) ^{A-B}	7.13 (0.12) ^{A, C}	4 x 10 ²
LW-s	0.58 (0.08) ^{A-B}	8.34 (0.32) ^A	14.54 (1.15) ^A	8.26 (0.32) ^{A, D}	6.99 (0.33) ^A	7.49 (0.33) ^A	2 x 10 ²
Negative Control	0.59 (0.08) ^{A-B}	8.50 (0.15) ^A	13.60 (0.90) ^{A-B}	8.41 (0.15) ^A	7.03 (0.20) ^A	7.57 (0.12) ^A	2 x 10 ²
GW-s	0.55 (0.09) ^A	8.39 (0.32) ^A	14.93 (1.69) ^A	8.31 (0.33) ^A	7.03 (0.39) ^A	7.58 (0.36) ^A	2 x 10 ²

*Samples are defined in the text.

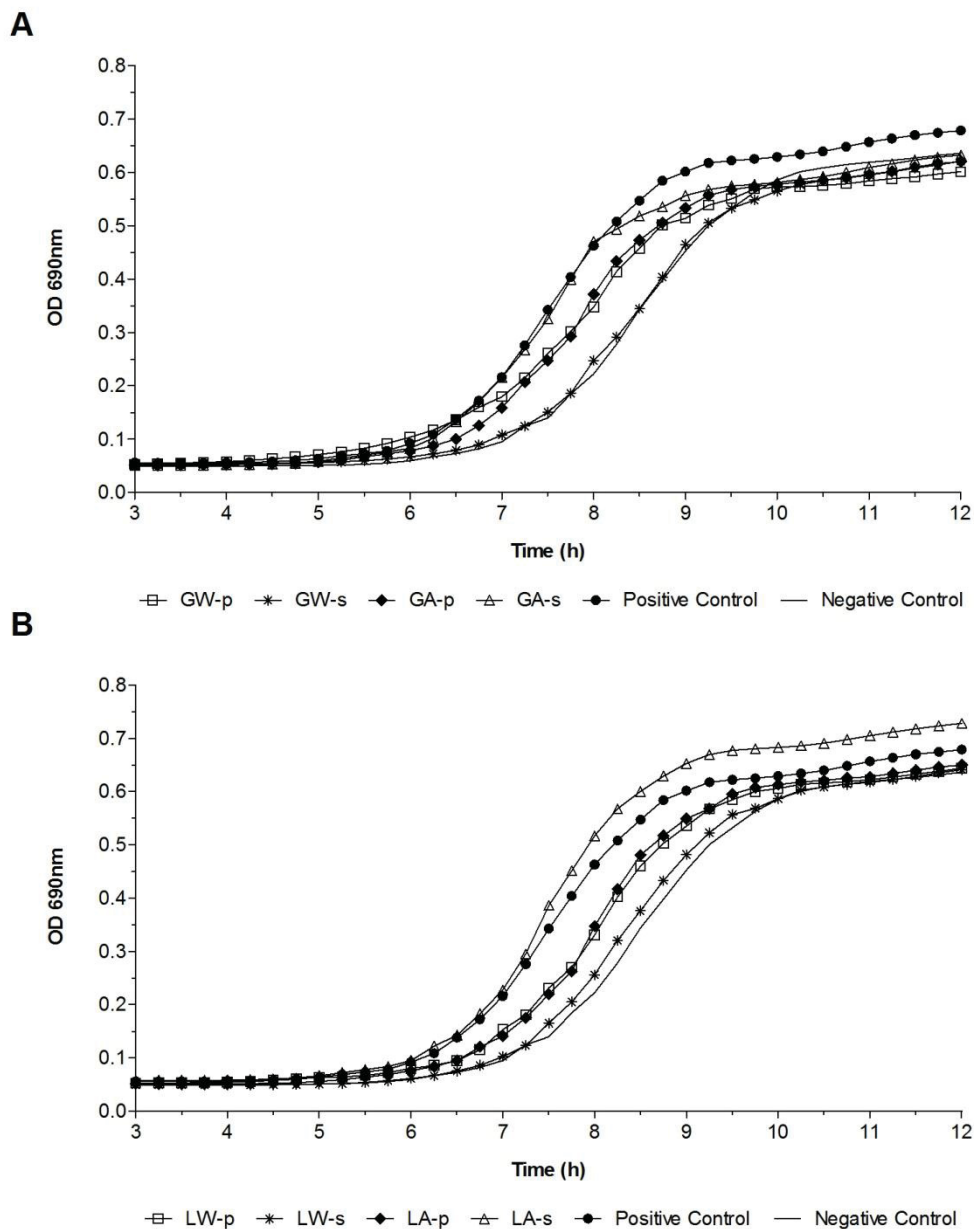
NOTE: These data represent the means obtained from sigmoidal equation and their derivatives for each variables (A, B, C) and secondary parameters (t_{pi} , t_{det} and $t_{OD=0.1}$) used to evaluate the bacterial growth and to estimate the microalgae extracts capacity to adhere to *S. typhimurium*. The means marked by different letters are significantly different ($P < 0.05$). Extracts with the shortest $t_{OD=0.1}$ (h) (detection time) bound more bacteria. The standard deviation of the mean is presented in parentheses.

Regarding the other parameters, A, B and C, according to BECKER *et al.*, (2007), parameter A (which corresponds to asymptotic OD in the stationary phase) is almost constant for low starting cell densities and increases with higher starting cell densities. For example, the GW-s, fraction with a lower binding ability, the parameter A reached 0.55, already the parameter A in the LA-s, fraction with a higher binding ability, reached 0.65 (TABLE 11). Parameter B correspond to time after incubation at which half of the maximal yield has been reached, and together with t_{pi} , t_{det} and $t_{OD=0.1}$ decrease with an increasing starting cell density BECKER *et al.* (2007). This can be observed in the fractions with the highest binding capacity LA-s, GA-s, GW-p, GA-p

and LW-p for all parameters cited that were statistically equivalent to the positive control. Parameter B increased progressively among the faster fractions, from the lowest value 7.48 (GA-s) to 7.99 (LW-p), whereas the fractions similar to negative control present values higher than 8. The other fractions, LA-p, LW-s and GW-s, showed higher growth parameters for t_{pi} , t_{det} and $t_{OD=0.1}$ than the positive control, indicating slower growth and a lower starting cell density. The constant that determines the sharpness of the switching characteristic of the curve is represented by the parameter C, which should decreased linearly with an increasing starting cell density (BECKER *et al.*, 2007). For this parameter was observed almost no difference between the samples tested, presenting average value of 13.74, except by GW-p that present the lower value with 11.98, however with the highest standard deviation. This suggests that the starting cell density of bacteria was not different enough to cause a change in the value of this constant.

The blank had no growth and negative control and the media control had no growth until after 7.5 and 16 hours, respectively. The adhesion curves of *P. gyrans* and *P. lutheri* extracts (FIGURE 39, respectively) showed clearly that some fractions had detection times similarly to the positive control and other fractions had lower binding ability similar to the negative control.

FIGURA 39 - ADHESION CURVES OF *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028 IN MICROTITRATION PLATES COATED WITH (A) *Pavlova gyrams* EXTRACTS AND (B) *P. lutheri* EXTRACTS

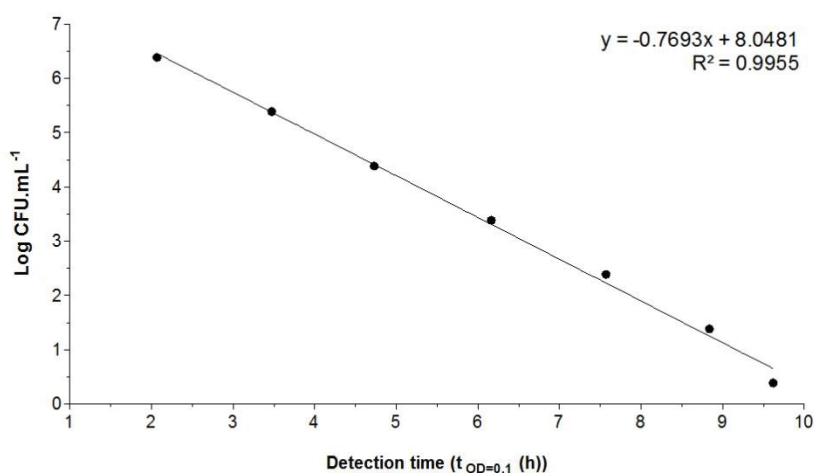


Data represent mean values.

A linear regression (FIGURE 40) was compiled by plotting the CFU.mL^{-1} against the detection time, in hours, when serial dilutions of bacterial reached an optical density of 0.1. The R^2 for fitting of the regression curve was 0.995, indicating excellent fit. The quantitative adhesion numbers ($\text{CFU}/3 \text{ mg}$) between bacteria and microalgae extracts are listed in TABLE 12. These results are in accordance with adhesion curves and growth parameters, where the fractions with higher bound

ability presenting between 4×10^2 and 9×10^2 UFC of bound bacteria, including the positive control.

FIGURA 40 - LINEAR REGRESSION FOR *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028



Detection time: time in hours necessary for bacteria to reach an optical density of 0.1.

The fractions having higher binding ability were analyzed by chemical and spectroscopic methods (TABLE 12). Although, in adhesion test, these fractions demonstrated the same binding ability, they were chemically distinct. Only GW-p and LW-p, showed a high content of carbohydrates (between 50 and 70 %), composed mainly of glucose (between 90 and 100 %), which indicates that this fraction comprises glucans. Alkaline fractions from *P. gyrans* e *P. lutheri*, soluble on frozen-thawing treatment, LA-s and GA-s respectively, presented the shortest time detection, and similar chemical analyses. Primarily the content of carbohydrates and proteins about 12 and 30 % respectively, and three mainly sugars, mannose about 15 %, galactose around 25 % and glucose approximately 30 %. The alkaline fraction GA-p, precipitated on frozen-thawing treatment, also presented similarly chemical profile. The other fractions with no binding capacity (similarly to negative control) like LW-s and GW-s present high content of carbohydrates, which were characterized as branched glucan β -(1 \rightarrow 3,6)-linked (data not shown).

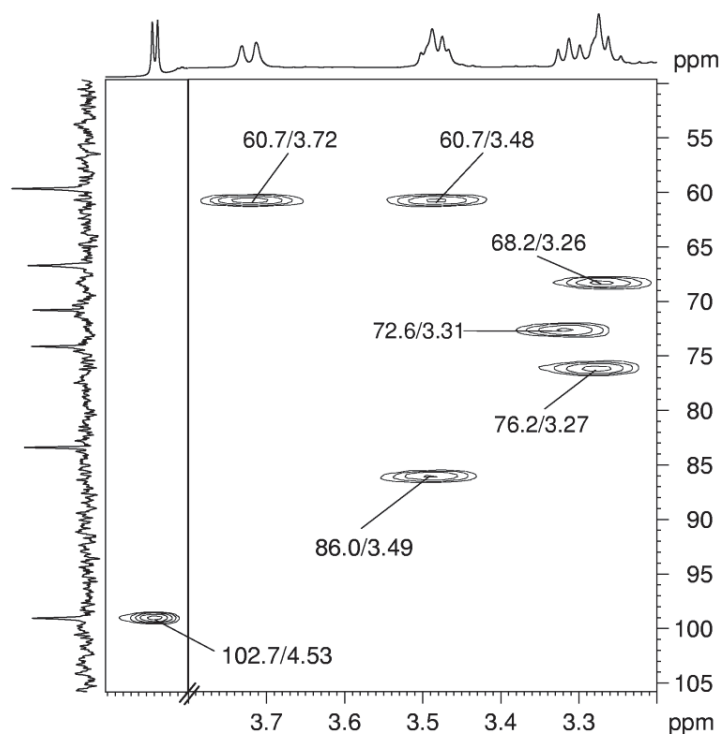
TABLE 12 - YIELDS, CHEMICAL ANALYSES AND MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF SAMPLES OBTAINED FROM *P. gyrans* AND *P. lutheri* WITH THE HIGHER BINDING CAPACITY

Fractions*	Yield ^a (%)	Cho ^b (%)	Ptn ^c (%)	Monosaccharides ^d (mol %)						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
LA-s	0.9	12.5	24.7	5.5	7.7	8.2	8.1	15.4	24.9	30.2
GA-s	0.4	12.1	30.4	4.1	6.6	8.9	11.5	12.2	24.2	32.5
GW-p	0.9	70.1	9.0	Tr ^e	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	100
GA-p	1.2	9.2	23.8	5.2	6.5	3.7	10.6	21.6	16.0	36.4
LW-p	1.0	47.4	12.4	2.1	2.5	Tr	Tr	1.5	2.0	91.2

*Fractions are defined in the text; ^a Yield is calculated based on dried biomass; ^b Cho: carbohydrate as determined by DUBOIS *et al.* (1956); ^c Ptn: protein as determined by LOWRY *et al.* (1951); ^d Monosaccharides were quantified in the acetate alditol form by GC-MS (as described in experimental section). Rha corresponds to rhamnose, Fuc to fucose, Ara to arabinose, Xyl to xylose, Man to mannose, Gal to galactose, Glc to glucose; ^e Tr: Lower than 1 %.

The HSQC spectrum of GW-p (FIGURE 41) showed the typical correlations observed in a linear (1→3)-linked β -glucan, with the assignment of signals for ^{13}C at δ 102.7 (C-1), 86.0 (C-3), 76.2 (C-5), 72.6 (C-2), 68.2 (C-4) and 60.7 (C-6) and its corresponding hydrogen δ 4.53 (H-1), 3.49 (H-3), 3.27 (H-5), 3.31 (H-2), 3.27 (H-4), 3.72 (H-6) 3.48 (H-6') (Carbonero *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2008; Ruthes *et al.*, 2008). The spectrum of LW-p showed exactly the same signals (data no shown) indicating the presence of glucan β -(1→3)-linked.

FIGURA 41 - HSQC SPECTRUM OF LINEAR β -GLUCAN (1 \rightarrow 3)-LINKED IN THE GW-P FRACTION OBTAINED FROM *Pavlova gyrams*



Note: In $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ at 70°C .

The ^1H NMR spectra of alkaline fractions (data not shown) did not show signals in the carbohydrate region; these results are in accordance with the lower content of total carbohydrates observed in the chemical analyses. Moreover, these results showed signals in region of hydrogen-nitrogen linkage between 0.5-2.5 ppm and in region of peptide linkage (amide bond) between 5-8.5 ppm (Silverstein, Webster e Kiemle, 2010).

Discussion

The method adapted from BECKER *et al.* (2007) and GANNER *et al.* (2010) employed microplates with polystyrene surface that ensure the binding of different binding matrices. The hydrophilized high-binding polystyrene plates mediate product binding via hydrogen bonds, mimicking the intestine epithelium, consisting mainly of glycosylated compounds (BECKER *et al.*, 2007). The non-specific binding sites were subsequently blocked with a purely proteinaceous product (BSA) to demonstrate specific binding between the fractions tested and the bacteria. Thereby, BSA served

as a negative binding matrix (SOKURENKO *et al.*, 1995), although cannot be expected that BSA will behave an inert manner with bacteria, because some of these might have a binding affinity to it (BECKER E GALLETTI, 2008). The positive control, used in this study, is a commercial product derived from yeast cell walls. Its use has been proposed by enterobacteria bind, such as *E. coli* and *Salmonella sp.*, and exhibit prophylactic properties to the intestine.

Enterobacteria in general, have type 1 fimbriae, known for their mannose-specific lectins. These lectins recognize carbohydrates, mannose, located in the host intestinal surface, in order to establish the first step of infection, the adhesion (OFEK *et al.*, 1977; OFEK E BEACHEY, 1978; FIRON *et al.*, 1984; ALTHOUSE *et al.*, 2003)

Only a minority of adhesins have been identified and characterized experimentally in *Salmonella*, the most affinity described were analyzed in *E. coli* (YUE *et al.*, 2012). Already, there are data showing significant heterogeneity among adhesions from different genera and even within the same species or serovar with respect to binding properties for mannosylated ligands (GRZYMAJŁO *et al.*, 2010).

Some studies revealed that mannose-binding protein (MBP) from rats is capable of binding, beside mannose, others carbohydrates like GlcNAc, L-Fuc and Glc with nearly equal affinity, however 3- and 4-OH-free of hexoses are absolutely indispensable for the binding activity of MBP (LEE *et al.*, 1991; QUESENBERRY *et al.*, 1997; LEE e LEE, 2000).

BOUCKAERT *et al.* (2005) determined type-1 lectin binding affinities, in *E. coli*, for several hexoses and found that 2-OH group mannose is the most important to affinity. Removal of the 2-OH is clearly less destructive than its equatorial position as in glucose, which binds lectin more weakly than mannose. Thus is suggested that mannan-oligosaccharides (MOS), like other carbohydrates, could act as decoy via bacteria adsorption. Thus prevents the adhesion to intestinal cells and allow bacteria eradicated out of the host (SHARON e OFEK, 2000; OFEK *et al.*, 2003).

In the current study, mannose is not prevalent sugar in the fractions that demonstrated the same binding capacity as the positive control. The alkaline fractions demonstrated high potential to bind mannose-specific fimbriae. However, these fractions did not have high carbohydrate content and exhibit heterogeneous monosaccharide composition containing around 30 % of glucose, that can be recognize by type-1 lectins (BOUCKAERT *et al.*, 2005), and between 15 and 22 % of

mannose. This observation indicates that lower amounts of carbohydrates could be responsible for the binding ability, reinforcing the idea that the most important for bacteria binding are monosaccharides and link configuration.

The interaction between type-1 lectin and GW-p or LW-p fraction, composed mainly of β -glucans (1 \rightarrow 3)-linked, could be explained once type 1-adhesin recognize glucose, although with lower affinity (QUESENBERRY *et al.*, 1997; BOUCKAERT *et al.*, 2005). Also, according HUNG *et al.* (2002) the domain bind-receptor interact with almost all OH groups from mannose, indicating that glycosidic linkage at O-3 could be not detrimental to binding, remaining the other OH groups to interact. Furthermore, the three-dimensional structure of mannan is important for pathogen immobilization, rather than the total amount of mannan, given that pure standardized mannan does not bind to *E. coli* (GANNER *et al.*, 2008). Therefore, probably the three-dimensional structure of β -glucans, typical triple-helix (SLETMOEN e STOKKE, 2008), present in microalgae fractions, could have favorable to bacteria binding.

Additionally, is important emphasize that fractions were mainly composed by branched glucans β -(1 \rightarrow 3,6)- linked, LW-s and GW-s, not presented potential to bind capacity bacteria. This result suggests the OH-6 unsubstituted is somehow important for interaction with *S. typhimurium*. HUNG *et al.* (2002) reported that O-6 of mannose directly interacts with the backbone from Asp47, present at domain receptor-bind of lectin, thereby O-6 substituted glucans may be deleterious to binding affinity.

Yeast cell wall fractions and yeast autolysate products were analyzed by GANNER *et al.* (2013) regarding their binding capacity to *E. coli* and *S. typhimurium* relating to different amount of mannan, glucan and proteins of different yeast strains. In accordance with the results of the *S. typhimurium* binding affinity is highly correlated with the presence of glucans, whereas the mannan content is important for *E. coli* binding. These findings would explain why the tested fractions in current study demonstrated high binding ability despite having low mannose content. As GANNER *et al.* (2013) we believe that are many unknown factors that influencing binding affinity of these pathogens, apart from mannan and glucan content. The adhesion process might be involved by other non-specific or hydrophobic interactions (OFEK *et al.*, 2003).

Additionally, the presence of proteins in these fractions could be cooperating synergistically with polysaccharides and binding the bacteria through other mechanisms. SHOAF-SWEENEY *et al.* (2008) determined that a single carbohydrate molecule would have a low affinity, but that the creation of individual protein subunits with numerous oligosaccharide binding sites assembled into a filamentous structure, leading to increased target avidity. MALDONADO-GOMEZ *et al.* (2015) found at bovine colostrum, besides oligosaccharides, some proteins like lactoferrin and β -lactoglobulin that have been show to have anti-adherence properties against *H. pillory*, *E. coli*, among others. Given the high content of proteins observed in the extracts is possible that occur some interaction among these adhesins capable to binding proteins.

A hypothesis for this result is that most pathogens possess genes encoding more than one type of adhesin (OFEK *et al.*, 2003) and some these could interact with the molecules present in the microalgae extracts. In *S. typhimurium* the phenotic expression of type 1 fimbriae is encoded by *fim* genes, composed by *fimAICDHFZYW* from which *fimH* has been show to encode the adhesion which confers mannose sensitivity of the type 1- fimbrial adherence (SWENSON e CLEGG, 1992; FÀBREGA e VILA, 2013). Besides type 1 fimbriae other adhesins could be related with binding to the host cell. At least two are the most know, it is *lpf* and *pef*, which encode long polar fimbriae and plasmid-encoded fimbriae, respectively. (BÄUMLER *et al.*, 1996) report that a mutation in *lpfC*, resulted in reduced adhesion of *S. typhimurium* to Hep2- cells. The *lpf* gene is also important because mediate adhesion to M cells. *Pef* fimbriae specifically bind to the trisaccharide Gal β 1 \rightarrow 4(Fuc α 1 \rightarrow 3)GlcNAc, also known as the Lewis X blood group antigen (FÀBREGA e VILA, 2013). According DORSEY *et al.* (2005) there are still other adhesins like ShdA and MisL capable to bind extracellular matrix proteins as fibronectin, this protein could be binding also by curli fibers (thin aggregative fimbria) encoded by two operons *csgBAC* and *csgDEFG* (COLLINSON *et al.*, 1993). Several fimbrial operons reportedly being carried within the *Salmonella* genome, no information is available about the binding specificity of their products (FÀBREGA e VILA, 2013).

BÄUMLER *et al.* (1996) also observed differs in the adhesiveness of *S. typhimurium* ATCC 14028 and other strains may be due to levels of expression of

their type 1 fimbriae, indicating that differences among bacteria strains should be taken into account. BODDICKER *et al.* (2002) found that two strains of *S. typhimurium*, which express allelic variants of FimH protein differing by two amino acid residues, adhere weakly and strongly to human HEp-2 cells. It is important to note that one or a few amino acid substitutions in the mannose-inhibitable type 1 fimbrial adhesion FimH of *Salmonella* can modulate the binding properties like affinity for mannose or other receptors (GRZYMAJŁO *et al.*, 2010; YUE *et al.*, 2012).

Recently, suggested mannose specific type-I fimbriae play an important role and furthermore, unknown mechanisms which might interact synergistically are probably involved. Moreover, biological variation and diversity of natural products make binding capacity predictions even more difficult and comprehensive (GANNER *et al.*, 2013).

We are limited by this method to explain how the binding between the molecules present in the fractions and bacteria occur or determine if any unknown factors may be involved, i.e. the mechanisms involved cannot be elucidated. However, it seems clear that some other binding mechanisms, not yet fully understood or unknown, may be involved. Therefore, studies on a molecular level, to elucidate on the additional forces which might be involved in the binding mechanism between microalgae extracts and *S. typhimurium* are necessary. Finally, *in vivo* experiments with challenged animals, could also contribute to validate the binding potential of microalgae extracts and the study of the binding capacity.

Infectious diseases caused by pathogenic bacteria, such as *Salmonella sp.*, can be a serious public health problem. Furthermore, animals with enteric infections cause considerable economic losses in livestock farming. Therefore, the industry has developed formulations that can be added to animal feed to prevent enteric infections. Prevention of bacterial adhesions is now regarded as a promising strategy for reducing infectious disease without the use of antibiotics. Although the use of antibiotics could be highly effective, it resulted in substantial stress on the target bacterium, which rapidly selected for resistance subpopulation. If the majority of non-resistant cells are killed the smaller fraction that is resistant may quickly grow and become the dominant proportion of the population (RASKO e SPERANDIO, 2010). It follows that spread of bacteria resistant to the anti-adhesion agents is expected to

occur at significantly lower frequencies than that of bacteria resistance to antibiotics (OFEK *et al.*, 2003).

Generally, microalgae produce polysaccharides composed of glucose, called glucans, and the glycosidic linkages vary among classes, families and divisions to which belong (Brown *et al.* 1997; Painter 1983). In microalgae, most glucans are α -(1 \rightarrow 4)-linked, similarly to amylopectin in starch (PAINTER 1983), whereas β -glucans are common in diatoms, chromist and haptophyta (STØRSETH *et al.* 2005; GRANUM AND MYKLESTAD 2002; MYKLESTAD *et al.* 2009).

Glucans β -(1 \rightarrow 3)-linked and β -(1 \rightarrow 3,6)-linked belong to a group of physiologically active compounds called (BRM) (BOHN e BEMILLER, 1995; NOVAK e VETVICKA, 2008), which activates the immune systems against infections by virus, bacteria, fungi and parasite (MANTOVANI *et al.*, 2008). The immunostimulating effect of β -glucan is, probably associated, with the activation of macrophages and T-helper and natural killer (NK) cells (BOHN e BEMILLER, 1995). This characteristic makes the microalgae extracts even more interesting to animal health.

The use of bioactive compounds from microalgae has been considered recently as an alternative to prevent bacterial infections in animals and humans and to thus decrease the use of antibiotics (GUZMAN-MURILLO e ASCENCIO, 2000). Microalgae can be cultured at a large scale in bioreactors, which allow easy control of growth conditions and are low-cost and rapidly cultivated. Therefore, these organisms could be an alternative to the currently available commercial products derived from yeast cell walls, once biological activity was similar and will most likely have a low cost.

In summary, the extracts from Haptophyta microalgae demonstrated their binding capacity to *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *in vitro* as effectively as commercial products already employed in livestock feed for the control of zoonoses. These extracts are composed mainly of glucans and proteins, which indicate that mechanisms other beside binding by type-1 mannose-specific fimbriae recognition may be involved in the process of bacterial adhesion. Furthermore, microalgae demonstrated the potential to be used as an alternative to yeast cell wall products.

4 CONCLUSÕES

Exceto pelas frações aquosas solúveis em gelo-degelo, obtidas de *P. gyrans* e *P. lutheri*, Pgaq-s e Plaq-s (compostas por glucanas β -(1 \rightarrow 3,6)-ligadas), todas as frações testadas demonstraram capacidade de ligação a *Salmonella enterica* sv. Typhimurium estatisticamente igual ao controle positivo (produto comercial baseado no extrato bruto de parede celular de leveduras). Essas frações, especialmente as aquosas, são majoritariamente compostas por glucose, enquanto as alcalinas apresentam composição monossacarídica heterogênea, contendo cerca de 20 % de manose, dentre outros açúcares.

Não é possível avaliar a partir do método utilizado para os ensaios de ligação qual o mecanismo envolvido na ligação entre os extratos de microalgas e a bactéria. Entretanto, algumas inferências podem ser realizadas levando-se em consideração a característica dos extratos e a literatura a cerca das adesinas de reconhecimento presentes em *S. typhimurium*.

1 – Visto que os extratos apresentam algum teor de manose, não se extingue a possibilidade de interação deste açúcar com lectinas manose-sensíveis presentes em fimbrias do tipo 1, descritas para esta bactéria.

2 – Estudos relatam que lectinas manose-sensíveis podem ligar outros açúcares, mesmo que com menor afinidade, dentre eles glucose.

3 – A hidroxila do C-6 livre da glucose parece ser importante para ligação, uma vez que apenas as frações contendo glucanas β -(1 \rightarrow 3,6)-ligadas (ou seja com O-6 substituído em ligação glicosídica) não apresentaram atividade, enquanto as frações contendo glucanas lineares β -(1 \rightarrow 3)-ligadas apresentaram capacidade de ligação.

4 – Outras adesinas comumente expressas pela bactéria e de afinidade ainda desconhecida podem estar relacionadas a este processo de adesão.

5 – Algumas adesinas são capazes de reconhecer proteínas, os extratos em questão apresentam alto teor de proteína, podendo este também ser um dos mecanismos envolvidos.

6 – Todos estes eventos podem estar ocorrendo de forma sinérgica.

A partir disso, acredita-se que mecanismos ainda não estudados ou desconhecidos estejam envolvidos.

Os extratos de microalgas demonstraram alto potencial como alternativa ao uso do extrato de leveduras. É importante destacar que a obtenção de compostos bioativos, a partir de microalgas, é facilitada pela capacidade de produção em larga escala desses microrganismos de forma rápida e barata.

REFERÊNCIAS

ALTHOUSE, C. et al. Type 1 Fimbriae of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Bind to Enterocytes and Contribute to Colonization of Swine *In vivo*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6446-6452, 2003.

AMARAL, A. E. et al. An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 3, p. 473-478, 2008.

ASCÊNCIO, S. D. et al. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignment of digeneaside, a low-molecular-mass carbohydrate produced by red seaweeds. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 5, p. 677-682, 2006.

BEACHEY, E. H. Bacterial Adherence: Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. **Journal of Infectious Diseases**, v. 143, n. 3, p. 325-345, 1981.

BECKER, P. M.; GALLETTI, S. Food and feed components for gut health-promoting adhesion of *E. coli* and *Salmonella enterica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 11, p. 2026-2035, 2008.

BECKER, P. M. et al. Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2686 - 9696, 2007.

BENDIF, E.M, et al. Integrative Taxonomy of the Pavlovophyceae (Haptophyta): A Reassessment. **Protist**. v.162, n.5, p. 738-761, 2011.

BODDICKER, J. D. et al. Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the fimH gene of the fim gene cluster. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1255-1265, 2002.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1 \rightarrow 3)- β -d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1995.

BOROWSKY, L.; CORÇÃO, G.; CARDOSO, M. Mannanoligosaccharide agglutination by *salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, P. 458-464, 2009.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1–3, p. 313-321, 1999.

BOUCKAERT, J. et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 441-455, 2005.

BROWN, M. R. et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, n. 1–4, p. 315-331, 1997.

BURGER, O. et al. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 295-301, 2000.

BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 5, p. 1862-1865, 1996.

CARBONERO, E. R. et al. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 252-257, 2006.

COLLINSON, S. K. et al. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 1, p. 12-18, 1993.

DORSEY, C. W. et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 196-211, 2005.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 2014/05/05 1956.

EBERSBACH, T. et al. Xylo-oligosaccharides inhibit pathogen adhesion to enterocytes *in vitro*. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 1, p. 22-27, 2012.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* Seroovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 308-341, 2013.

FERKET, P. **Strategies for finding alternatives to growth promoters**. In: Latin American Poultry Congress, XXII, 2011, Buenos Aires. Artigo Técnico...Buenos Aires: International business community related to animal production, 2011. Disponível em: <<http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/management/articles/strategies-finding-alternatives-growth-t1771/124-p0.htm>>. Acesso em: 02/01/2012

FIRON, N. et al. Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to yeast and intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 2, p. 472-476, 1987.

FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. **Infection and Immunity**, v. 43, n. 3, p. 1088-1090, 1984.

FRONZES, R.; REMAUT, H.; WAKSMAN, G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. **Embo Journal**, v. 27, n. 17, p. 2271-2280, 2008.

GANNER, A.; FINK, L.; SCHATZMAYR, G. Quantitative *in vitro* assay to evaluate yeast products concerning their binding activity of enteropathogenic bacteria. **Journal of animal science**, v. 86, n. E: suppl. 2, p. 54, 2008.

GANNER, A. et al. Quantitative evaluation of *E. coli* F4 and *Salmonella Typhimurium* binding capacity of yeast derivatives. **AMB Express** **C7 - 62**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2013.

GANNER, A. et al. Quantitative *in vitro* assay to evaluate the capability of yeast cell wall fractions from *Trichosporon mycotoxinivorans* to selectively bind gram negative pathogens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p. 168-174, 2010.

GRANUM, E.; MYKLESTAD, S. A simple combined method for determination of β -1,3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms. **Hydrobiologia**, v. 477, n. 1-3, p. 155-161, 2002.

GROOT, J. C. J. et al. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 77-89, 1996.

GRZYMAJŁO, K. et al. The high-adhesive properties of the FimH adhesin of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis are determined by a single F118S substitution. **Microbiology**, v. 156, n. 6, p. 1738-1748, 2010.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L. e CHANLEY, M. H. (Ed.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York, USA.: Plenum, 1975. p.29-60.

GUZMAN-MURILLO, M. A.; ASCENCIO, F. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 473-478, 2000.

HAJATI, H.; REZAEI, M. The application of prebiotics in poultry production. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 3, p. 298-304, 2010.

HUNG, C.-S. et al. Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 903-915, 2002. ISSN 1365-2958.

JANSSON, P.-E. et al. **A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates**. Stockholm: 1976.

JONES, C. H. et al. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 6, p. 2081-2085, 1995.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185-202, 2006.

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v. 109, n. 1–3, p. 161-165, 2007.

LEE, R.; LEE, Y. Affinity enhancement by multivalent lectin–carbohydrate interaction. **Glycoconjugate Journal**, v. 17, n. 7-9, p. 543-551, 2000.

LEE, R. T. et al. Ligand-binding characteristics of rat serum-type mannose-binding protein (MBP-A). Homology of binding site architecture with mammalian and chicken hepatic lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 8, p. 4810-4815, 1991.

LINDHORST, T.K.; KIEBURG, C.; KRALLMANN-WENZEL, U. Inhibition of the type 1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli* to erythrocytes by multiantennary alpha-mannosyl clusters : the effect of multivalency. **Glycoconjugate Journal**. v. 15, p. 605-613, 1998.

LOKE, M. F. et al. Antiadhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of *Helicobacter pylori* to gastric mucin. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 231-238, 2007.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MALDONADO-GOMEZ, M. X. et al. Adherence inhibition of enteric pathogens to epithelial cells by bovine colostrum fractions. **International Dairy Journal**, v. 40, n. 0, p. 24-32, 2015.

MANTOVANI, M. S. et al. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 154-161, 2008/4// 2008.

MARTÍN-SOSA, S.; MARTÍN, M.-J.; HUESO, P. The Sialylated Fraction of Milk Oligosaccharides Is Partially Responsible for Binding to Enterotoxigenic and Uropathogenic *Escherichia coli* Human Strains. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 10, p. 3067-3072, 2002.

MORAN, C.A. Nutritional approaches to controlling *Salmonella*. Disponível em: <<http://www.pigprogress.net/pigs/disease-management/nutritional-approaches-to-controlling-salmonella-5919.html>>. Acesso em: 15/09/2011.

MYKLESTAD, S. M.; GRANUM, E.; STONE, A. B. B. F. A. Chapter 4.2 - Biology of (1,3)- β -Glucans and Related Glucans in Protozoans and Chromistans. In: (Ed.). **Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides**. San Diego: Academic Press, 2009. p.353-385.

NAKAZATO, G. et al. *Lactobacillus acidophilus* decreases *salmonella typhimurium* invasion *in vivo*. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 2, p. 284-289, 2011.

NEESER, J.-R. et al. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. **Glycobiology**, v. 10, n. 11, p. 1193-1199, 2000.

NEESER, J. R.; KOELLREUTTER, B.; WUERSCH, P. Oligomannoside-type glycopeptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili: preparation of potent inhibitors from plant glycoproteins. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 2, p. 428-436, 1986.

NICHOLLS, K.H; JOHN, D.W; ROBERT, G.S. 13 - Haptophyte algae. In: *Freshwater Algae of North America*. Academic Press, Burlington, p. 511-521, 2003.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. **Journal of Immunotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 47-57, 2014/11/14 2008.

OFEK, I.; BEACHEY, E. H. Mannose Binding and Epithelial Cell Adherence of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 22, n. 1, p. 247-254, 1978.

OFEK, I.; HASTY, D. L.; SHARON, N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 181-191, 2003.

OFEK, I.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. **Nature**, v. 265, n. 5595, p. 623, 1977.

PAINTER, T. J. Algal Polisaccharides. In: ASPINALL, G. O. (Ed.). **The Polysaccharides**. Oxford, v.2, 1983. p.195-285.

PATON, A. W.; MORONA, R.; PATON, J. C. Designer probiotics for prevention of enteric infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 193-200, 2006.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2008.

PONIS, E. et al. *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. **Aquaculture**, v. 282, n. 1–4, p. 97-103, 2008. ISSN 0044-8486.

PONIS, E. et al. Nutritional value of six Pavlovophyceae for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae. **Aquaculture**, v. 254, n. 1–4, p. 544-553, 2006.

QUADRI, F.; HAQUE, A.; FARUQUE, S. M.; BETTELHEIM, K. A.; ROBINS-BROWNE, R.; ALBERT, J. Hemagglutinating Properties of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 510-514, 1994.

QUESENBERRY, M. S.; LEE, R. T.; LEE, Y. C. Difference in the binding mode of two mannose-binding proteins: demonstration of a selective minicuster effect. **Biochemistry**, v. 36, n. 9, p. 2724-2732, 2014/11/12 1997.

QUINTERO, M. et al. Adherence Inhibition of *Cronobacter sakazakii* to Intestinal Epithelial Cells by Prebiotic Oligosaccharides. **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1448-1454, 2011.

QUINTERO-VILLEGAS, M. I. et al. Adherence inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by chitooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2748-2754, 2013.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 117-128, 2010.

RUTHES, A. C. et al. Polysaccharides present in cultivated *Teloschistes flavicans* symbiosis: Comparison with those of the thallus. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 500-505, 2008.

SHARON, N.; OFEK, I. Safe as mother's milk: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. **Glycoconjugate Journal**, v. 17, n. 7-9, p. 659-664, 2000.

SHOAF, K. et al. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 12, p. 6920-6928, 2006.

SHOAF-SWEENEY, K. D.; HUTKINS, R. W.; STEVE, L. T. Chapter 2 Adherence, Anti-Adherence, and Oligosaccharides: Preventing Pathogens from Sticking to the Host. In: (Ed.). **Advances in Food and Nutrition Research**: Academic Press, v. Volume 55, 2008. p.101-161.

SILVERSTEIN, M. R.; WEBSTER, X. F.; KIEMLE, J. D. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda., 2010.

SLETMOEN, M.; STOKKE, B. T. Higher order structure of (1,3)- β -D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities. **Biopolymers**, v. 89, n. 4, p. 310-321, 2008.

SOKURENKO, E. V. et al. [41] Bacterial adhesion measured by growth of adherent organisms. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. 253,. p.519-528, 1995.

STØRSETH, T. R. et al. Structural characterization of β -d-(1 \rightarrow 3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros mülleri* and *Thalassiosira weissflogii*. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 6, p. 1159-1164, 2005.

SWENSON, D. L.; CLEGG, S. Identification of ancillary fim genes affecting fimA expression in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 23, p. 7697-7704, 1992.

SPEARMAN, K. R. **Effect of mannan oligosaccharide (mos) supplementation on The immune status of mares and their foals**. Dissertation (Master of Science) – Department Animal Sciences, University of Florida, Florida, 2004.

SPRING, P.; PRIVULESCU, M. Mannan-oligosaccharide: its logical role as a natural feed additive for piglets. Disponível em: < <http://en.engormix.com/MA-pig-industry/nutrition/articles/mannanoligosaccharide-its-logical-role-t751/141-p0.htm>>. Acesso em: 02/01/2012.

SVS. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Disponível em: <<http://www.svs.gov.br>>. Acesso em: 20/11/2014.

VAN ASTEN, A. J. A. M.; VAN DIJK, J. E. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 251-259, 2005.

WAGNER, C.; HENSEL, M. Adhesive Mechanisms of *Salmonella enterica*. In: LINKE, D.; GOLDMAN, A. **Bacterial adhesion- Chemistry, Biology, Physics (Advances in Experimental Medicine and Biology)**. New York: Springer, 2011. p. 17-34.

WEISSMAN, S. J. et al. Enterobacterial adhesins and the case for studying SNPs in bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 115-117, 2003.

WILSON, J. W. et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 918, p. 216-224, 2002.

YUE, M. et al. Diversification of the *Salmonella* Fimbriae: A Model of Macro- and Microevolution. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38596, 2012.

**CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA DOS EXTRATOS
OBTIDOS A PARTIR DAS MICROALGAS *P. gyrans* e *P. lutheri***

1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) é comumente habitado por centenas de gêneros de bactérias, comunidade denominada de microbiota intestinal, que confere benefícios ao hospedeiro (QUIGLEY, 2010). Uma das principais funções da microbiota é a manutenção da integridade do epitélio e imunidade intestinal, uma vez que as bactérias comensais fazem parte da primeira linha de defesa (LAPARRA e SANZ, 2010). Comercialmente, estas espécies de bactérias capazes de conferir benefícios à saúde do hospedeiro são denominadas probióticos.

Estudos têm demonstrado que a microbiota do intestino fermenta alguns carboidratos não digeríveis da dieta e faz biossíntese de vitaminas do complexo B e K (MUSSATTO e MANCILHA, 2007; QUIGLEY, 2010). Além disso, ao fermentá-los produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que podem ser utilizados como fonte de energia pela mucosa, ou ainda, serem capazes de inibir ou matar bactérias patogênicas (QUIGLEY, 2010). Muitas doenças comuns do TGI já têm sido associadas a um desbalanço na microbiota intestinal.

Devido ao seu desenvolvido maquinário enzimático, estas bactérias têm um alto potencial para utilização de polissacarídeos com estruturas químicas complexas. Baseado nisso, é que se define o termo prebióticos, produtos específicos não digeríveis e fermentáveis pelas bactérias intestinais capazes de aumentar a quantidade ou a atividade de bactérias benéficas no intestino, visando saúde e bem-estar ao hospedeiro (CRONIN *et al.*, 2011).

Tanto produtos probióticos, como os prebióticos e simbióticos (misto de probióticos e prebióticos) têm sido altamente explorados pela indústria farmacêutica, alimentícia e de saúde animal, visto o valor econômico agregado à produtos com tantos benefícios associados. Com base no exposto, e visando ainda a complementaridade de todas as partes deste trabalho, os extratos das microalgas marinhas *P. gyrams* e *P. lutheri* foram avaliados quanto ao seu potencial prebiótico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O TRATO GASTROINTESTINAL

O trato gastrointestinal compreende várias regiões distintas anatomicamente, o estômago, o intestino delgado (subdividido em duodeno, jejuno e íleo) e o intestino grosso (subdividido em cólon ascendente, transversal, descendente e o reto). Ao longo destes segmentos ocorrem diferentes condições físico-químicas, por exemplo, a variação de pH entre o estômago e a primeira porção do intestino delgado com a presença de sais biliares. Tais alterações na fisiologia refletem a densidade e a composição de microrganismos, que, normalmente, habita o intestino, em simbiose, ao longo do trato gastrointestinal (REMUS *et al.*, 2011; KLEEREBEZEM *et al.*, 2010; MELLITZER *et al.*, 2010).

Esta comunidade residente de microrganismos que habita o intestino (a microbiota intestinal), interage continuamente com a mucosa gastrointestinal e suas funções.

O epitélio gastrointestinal inclui muitos tipos celulares, entre eles células secretoras de glicoproteínas (como as mucinas que formam um muco protetor), de substâncias antimicrobianas, fatores de crescimento e hormônios que controlam o esvaziamento gástrico e a ingestão de alimentos. No entanto, o tipo celular mais abundante é o dos enterócitos, ligados por complexas junções. Sua principal função é a absorção e o metabolismo de nutrientes. Apresentam igualmente uma importante função na resposta imune intestinal inata e adaptativa, visto que reconhecem antígenos no lúmen e respondem através da secreção de citocinas (moléculas sinalizadoras e responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune) (REMUS *et al.*, 2011; WELLS *et al.*, 2011; KLEEREBEZEM *et al.*, 2010; MELLITZER *et al.*, 2010; SNOECK *et al.*, 2005).

2.2 A MICROBIOTA DO TRATO GASTROINTESTINAL (TGI)

O TGI humano, normalmente, é habitado por um complexo ecossistema que compreende aproximadamente 800 espécies de bactérias. A verdadeira extensão da quantidade e variedade de bactérias que habitam o intestino humano é, ainda, desconhecida. Ao nascimento, estes órgãos são estéreis e a colonização se inicia na primeira alimentação. O desenvolvimento da microbiota durante a infância é altamente influenciado por fatores ambientais, por esse motivo a colonização do intestino é distinta entre os indivíduos. A microbiota tem um papel importante no estado nutricional e de saúde do hospedeiro, sendo afetada pela idade, dieta, condições sócio-econômicas, e, também, pelo uso de antibióticos. Dentre estes fatores, o principal deve ser a dieta, visto que pode promover mudanças na diversidade de bactérias e afetar sua função no hospedeiro (SAAD, 2006; LAPARRA e SANZ, 2010; QUIGLEY, 2010; CRONIN *et al.*, 2011).

Devido ao peristaltismo dos órgãos do TGI e aos efeitos antimicrobianos do ácido gástrico, as porções de intestino mais proximais contém um pequeno número de bactérias em indivíduos saudáveis. O estômago e intestino delgado possuem, relativamente, baixas densidades bacterianas (10^3 - 10^5 organismos por grama ou mL de conteúdo luminal em ratos) que, consiste, principalmente de lactobacilos e estreptococos tolerantes ao ácido.

Em geral, as bactérias que vivem no intestino são anaeróbias facultativas no jejuno e anaeróbias no cólon, refletindo as baixas concentrações de oxigênio no TGI. Entre os principais gêneros existentes estão *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (LAPARRA e SANZ, 2010; QUIGLEY, 2010; SAAD, 2006).

A porção distal do intestino delgado, o íleo, é uma zona de transição com densidades bacterianas mais elevadas (10^8 por grama), e maior diversidade de espécies, mas a colonização mais densa acontece no cólon (10^{10} - 10^{12} por grama), que abriga mais de 400 espécies de bactérias. No intestino grosso, predominam as bactérias anaeróbias, especialmente *Bacteroides*, bifidobactérias, fusobactérias e peptostreptococci (cada grupo presente em cerca de 10^9 por grama). Em contrapartida, aeróbias e anaeróbias facultativas, incluindo enterobactérias e

lactobacilos, estão presentes em densidades moderadas (10^6 - 10^8 por grama) (LAPARRA e SANZ, 2010; MACPHERSON E HARRIS, 2004; QUIGLEY, 2010).

2.2.1 A microbiota intestinal e sua relação com a saúde do hospedeiro

As bactérias entéricas influenciam uma variedade de funções intestinais, exibem um papel importante na nutrição e manutenção da integridade da barreira epitelial e no desenvolvimento da imunidade da mucosa, além de desenvolverem estratégias para regular a aquisição de nutrientes e a utilização em simbiose com o hospedeiro em resposta a dieta. A atividade bioquímica deste ecossistema deve manter-se essencialmente balanceada para garantir a saúde do hospedeiro (SAAD, 2006; MELLITZER *et al.*, 2010; QUIGLEY, 2010; LAPARRA e SANZ, 2010; CRONIN *et al.*, 2011; REMUS *et al.*, 2011).

O epitélio intestinal é constituído por uma barreira física que regula o trânsito de substâncias exógenas e impede, principalmente, a entrada da maior parte dos antígenos do lúmen. Esta barreira é fortalecida por uma camada de muco constituída de mucinas (glicoproteínas), peptídeos antimicrobianos e outras secreções. As bactérias comensais fazem parte da primeira linha de defesa e participam da regulação da permeabilidade, por exemplo. Baseado nestes efeitos protetores, algumas cepas são conhecidas por seus efeitos benéficos entre eles, o tratamento de diarreia (VOLMAN, *et al.*, 2010; LAPARRA e SANZ, 2010; QUIGLEY, 2010).

Estudos genômicos e fisiológicos têm demonstrado que a microbiota intestinal apresenta enzimas especializadas na utilização de carboidratos não digeríveis e biossíntese de vitaminas. Além disso, estas bactérias entéricas comensais produzem ácidos graxos e peróxidos altamente específicos para inibir ou eliminar bactérias potencialmente patogênicas (LAPARRA e SANZ, 2010; QUIGLEY, 2010; MUSSATTO e MANCILHA, 2007).

As enzimas bacterianas também estão envolvidas no metabolismo de colesterol e ácidos biliares, sendo capazes de reduzir o colesterol à coprostanol e aumentar sua excreção nas fezes. Na presença de substratos como carboidratos fermentáveis, as bactérias crescem e sintetizam proteínas ativamente (em

quantidades muito variáveis) as quais podem ser utilizadas pelo hospedeiro (LAPARRA e SANZ, 2010; QUIGLEY, 2010).

Estas bactérias são particularmente ricas em genes envolvidos no metabolismo de carboidratos, indicando que polissacarídeos complexos são a fonte energética primária nestas colônias. Açúcares não digeríveis da dieta são metabolizados durante a fermentação por estas bactérias no cólon, e são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) – acetato, butirato e propionato, os quais são usados como fonte de energia pela mucosa, ou podem, ainda, serem utilizados pelo fígado e músculo com diferentes funções. Grande parte das proteínas codificadas pelo genoma destas bactérias está relacionada com o catabolismo de oligo e polissacarídeos, dentre elas estão as β -glicosidases, xilanases e arabinofuranosidades (CRONIN *et al.*, 2011).

2.2.2 Efeitos benéficos dos AGCC produzidos durante a fermentação dos carboidratos sobre a mucosa intestinal

Os AGCC's produzidos durante a fermentação de polissacarídeos provêm energia para o metabolismo do hospedeiro e ajudam na acidificação do intestino. Tal acidificação interfere no balanço e metabolismo das espécies bacterianas residentes, além da proliferação do epitélio intestinal (TOPPING e CLIFTON, 2001; SCHEPPACH, 1994; MADHUKUMAR e MURALIKRISHNA, 2010).

Com relação aos efeitos dos AGCC's no lúmen intestinal, a diminuição no pH ao longo do intestino, promovida pela fermentação de carboidratos não digeríveis pelas bactérias residentes, parece ser o efeito mais importante. Assim, apresentam eficiência na prevenção da multiplicação de bactérias patogênicas sensíveis ao pH, como a *Salmonella* e *E. coli* (TOPPING e CLIFTON, 2001). Entretanto, menos de 5% dos AGCC produzidos durante a fermentação são eliminados nas fezes, isso porque a maior parte é absorvida pelos enterócitos, dependendo da concentração. Pelo menos 60 % desse processo ocorre por simples difusão das moléculas protonadas ao longo do intestino grosso, enquanto o restante está relacionado com a entrada da molécula ionizada, envolvendo o transportador de Na^+ e K^+ . Além disso, a produção de AGCC também parece estar relacionada com o aumento da absorção de cátions divalentes como Ca^{2+} , devido ao aumento da absorção destes justamente nas

regiões do cólon onde é maior a produção de AGCC's (TOPPING e CLIFTON, 2001; SCHEPPACH, 1994).

Os ácidos graxos de cadeia curta, principalmente butirato, são rapidamente metabolizados pelas células do intestino delgado e do cólon e são fontes de energia preferenciais em relação à glucose e glutamina, por exemplo. Algumas doenças como a colite ulcerativa distal já são apontadas, em alguns estudos, como um defeito no metabolismo de butirato. Além disso, os AGCC's também podem ter efeito sobre a atividade motora do intestino, e na manutenção do fenótipo das células intestinais (TOPPING e CLIFTON, 2001).

O butirato é utilizado pelos enterócitos e, geralmente, considerado um metabólito saudável, devido a sua influência positiva no crescimento celular e proliferação, exercendo efeitos anti-inflamatórios. O acetato e o propionato podem acessar a circulação portal e influenciar o metabolismo de lipídios, enquanto o acetato parece contribuir para a síntese de lipídios e colesterol no fígado, o propionato pode inibir os efeitos do acetato (TOPPING e CLIFTON, 2001; SCHEPPACH, 1994; QUIGLEY, 2010).

2.3 PROBIÓTICOS

O termo probióticos foi utilizado pela primeira vez na década de 60 como oposto de antibiótico a fim de classificar os microrganismos como substâncias capazes de estimular o crescimento de outros microrganismos (BUTEL, 2014). O termo probióticos deriva do grego e significa “para a vida”, são definidos como microrganismos vivos, que, quando ingeridos em quantidade adequada exercem um benefício à saúde do hospedeiro (QUIGLEY, 2010). De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde) e a FAO (Food and Agriculture Organization) os probióticos também podem ser definidos com base nas características que as cepas bacterianas devem apresentar. As bactérias probióticas devem ser capazes de resistir ao estresse da digestão, como pH ácido do estômago e presença de sais biliares para chegar ao intestino e exercer seu papel benéfico ao hospedeiro. Os efeitos benéficos de uma determinada cepa devem estar cientificamente comprovados, bem como o fato de que sua ingestão não deve causar nenhum risco ao hospedeiro. Além disso, devem ser capazes de permanecer estáveis durante o

processo de produção e conservação da matriz do produto na qual foi incorporada (BUTEL, 2014). Trata-se das mesmas bactérias entéricas discutidas nas seções anteriores, entretanto comercializadas como suplementos, contendo estes microrganismos viáveis, a fim de aumentar sua concentração no intestino e, com isso, estimular seus efeitos benéficos para o hospedeiro.

Observações experimentais sugerem benefício para a melhora de doenças pancreáticas, gastrointestinais e de fígado, entretanto são confirmados os benefícios em três grandes áreas: infecções gastrointestinais, síndrome do intestino irritável e doença intestinal inflamatória. Com relação à diarreia infecciosa, os probióticos parecem ser efetivos ao diminuírem o tempo de duração da doença, além disso, podem prevenir as diarréias associadas ao uso de antibióticos. Também, tem sido estudada a eficácia dos probióticos na diminuição da incidência de colite ulcerativa e doença de Chron. A síndrome do intestino irritável tem sido associada ao desbalanço na microbiota intestinal e disfunção imune, com isso o tratamento com probióticos ao reestabelecer a microbiota do TGI pode colaborar com a melhora do quadro (KAPLAN e HUTKINS, 2000; QUIGLEY, 2010; LAPARRA e SANZ, 2010; MUSSATTO e MANCILHA, 2007).

Junto com o sistema imune as bactérias probióticas, que colonizam o intestino, contribuem significativamente para a barreira que previne o TGI de invasão por bactérias patogênicas (SLAVIN, 2013). Resultados obtidos por DE MORENO DE LEBLANC *et al.* (2010) mostram que a administração de *Lactobacillus casei* antes da infecção diminuiu a gravidade da infecção por *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium. Esses autores mostraram que a administração contínua (mesmo após a infecção) teve o melhor efeito. Além disso, colabora na prevenção de inflamação intestinal, através da estimulação do sistema imune inato (por meio da produção epitelial de citocinas, por exemplo) (PAGNINI *et al.*, 2010).

Os probióticos mais comuns são dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, por esse motivo e pelo fato de que este último foi o gênero utilizado na estratégia experimental do presente trabalho, o mesmo será analisado mais detalhadamente na seção a seguir.

2.3.1 O gênero *Lactobacillus*

O primeiro microrganismo deste gênero foi isolado por Moro há mais de um século atrás. Os membros do gênero *Lactobacillus* pertencem ao grupo de bactérias ácido-láticas (LAB) (KLEEREBEZEM, 2010; WELLS e MERCENIER, 2008). Estão distribuídos ao longo de todo o TGI, constituindo uma parte importante da microbiota intestinal de humanos e animais (CORZO-MARTÍNEZ *et al.*, 2013; GOMES e MALCATA, 1999), sendo associados à diversos efeitos benéficos como saúde e bem-estar (ALTERMANN *et al.*, 2005). Sua distribuição é afetada por fatores ambientais tais como pH, disponibilidade de oxigênio e substratos específicos.

Os lactobacillus são bactérias gram-positivas em forma de bastonetes não flagelados, que não formam esporos. Podem ser aerotolerantes ou anaeróbios estritos. No mínimo 56 espécies do gênero *Lactobacillus* já foram descritas na literatura. As espécies mais comuns para usos dietéticos são de *Lactobacillus acidophilus* (GOMES e MALCATA, 1999; KLEEREBEZEM, 2010). O tamanho típico desta espécie varia entre 0,6 a 0,9 µm de largura e 1,5 a 6 µm de comprimento. São bactérias mesófilas, ou seja, o crescimento ótimo ocorre entre 35 e 40 °C. A maior parte das cepas de *L. acidophilus* é capaz de fermentar celobiose, frutose, galactose, glucose, manose, maltose, lactose e sacarose (GOMES e MALCATA, 1999). O genoma de *Lactobacillus* codifica uma maquinaria sacarolítica especializada, que reflete a disponibilidade de nutrientes em seus respectivos ambientes (BARRANGOU *et al.*, 2006). O crescimento bacteriano é associado a produção de ácido lático, a partir da fermentação das fontes de carbono disponíveis (KLEEREBEZEM, 2010).

Os membros deste gênero podem contribuir para a digestão, absorção de nutrientes, prevenção de colonização por patógenos e estimulação da resposta imune em seres humanos (YANG *et al.*, 2011). Algumas cepas de *Lactobacillus acidophilus* assimilam o colesterol presente no meio, enquanto outras parecem inibir a absorção do colesterol através da parede intestinal (MUSSATTO e MANCILHA, 2007). Além disso, também podem estar relacionadas com a absorção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA's) (LAPARRA e SANZ, 2010).

Dentre a ampla variedade de carboidratos digeríveis por estas bactérias encontram-se xilo-oligossacarídeos, pectinas e fruto-oligossacarídeos. No entanto,

pode haver muitos mais polissacarídeos metabolizáveis ainda desconhecidos, devido a grande diversidade enzimática do metabolismo de açúcares produzida por estes organismos e, ainda, não totalmente desvendada (VARDAKOU *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2011; RAMNANI *et al.*, 2012; SYNYTSYA *et al.*, 2009; MADHUKUMAR e MURALIKRISHNA, 2010; WILLIAMS *et al.*, 2011; KAPLAN e HUTKINS, 2000).

2.4 PREBIÓTICOS

O conceito de prebióticos foi primeiramente introduzido por GIBSON e ROBERFROID (1995), os quais são descritos como ingredientes não digeríveis de alimentos, que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de alguns tipos de bactérias no cólon. Estes ingredientes podem, então, ser adicionados a dieta para promover a saúde em certos aspectos da microbiota residente do intestino. Esta definição vem sendo continuamente refinada, a mais recente considera os prebióticos como ingredientes que devem ser resistentes a acidez gástrica, a hidrólise por enzimas de mamíferos e a absorção gastrointestinal. Devem, também, ser fermentados por bactérias da microbiota intestinal e estimular, seletivamente, o crescimento e/ ou atividade de bactérias intestinais, associadas à saúde e ao bem estar do hospedeiro (ROBERFROID, 2007).

Em geral, os prebióticos são apontados como as fibras dietéticas dos alimentos, devido ao fato de não serem absorvidos e fornecerem substratos para as bactérias no intestino grosso (GIBSON *et al.*, 1995; GIBSON, 1999; SAAD, 2006; MUSSATTO e MANCILHA, 2007; LICHT *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2011). Muitas vezes, são utilizados como termos sinônimos embora nem todos os tipos de fibras solúveis e insolúveis tenham tido sua atividade testada. Todos os prebióticos são fibras, entretanto nem todas as fibras são prebióticas (SLAVIN, 2013).

Os prebióticos conhecidos atualmente são polissacarídeos não digeríveis, com baixo grau de polimerização. Os mais conhecidos são derivados de galactanas e outros de frutanas, como a inulina (CORRADINI *et al.*, 2004; SAAD, 2006; POMPEI *et al.*, 2008; LICHT *et al.*, 2012) os quais serão discutidos mais profundamente no próximo item. Entretanto, novas fontes de polissacarídeos com estruturas diversas vêm sendo exploradas, devido ao grande aparato enzimático das

bactérias intestinais, que aumenta grandemente a possibilidade de fermentação das mais variadas estruturas químicas. Dentre estas novas estruturas polissacarídicas estudadas encontram-se arabinoxilanas (VARDAKOU *et al.*, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2011), xilo-oligossacarídeos com manose e galactose em sua estrutura (MADHUKUMAR e MURALIKRISHNA, 2010), e oligossacarídeos obtidos a partir de agar e alginatos isolados de macroalgas (RAMNANI *et al.*, 2012).

Glucanas β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)-ligadas e glucanas β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-ligadas extraídas de cereais (SHEN *et al.*, 2012; ZHAO e CHEUNG, 2011; ZHAO e CHEUNG, 2013), fungos (SYNYTSYA *et al.*, 2009; ZHAO e CHEUNG, 2013; MURPHY *et al.*, 2013), macroalgas (ZHAO e CHEUNG, 2011; ZHAO e CHEUNG, 2013; MURPHY *et al.*, 2013) e bactérias (ZHAO e CHEUNG, 2011) também foram consideradas como potenciais prebióticos. Entretanto, até o momento, poucos dados foram encontrados na literatura relativos a fontes como microalgas (KUDA *et al.*, 2009), e pouco se sabe a respeito do mecanismo de utilização destas moléculas por bactérias probióticas (LAM e CHEUNG, 2013).

Pesquisas recentes com prebióticos têm evidenciado as diversas implicações na saúde, incluindo manutenção da saúde intestinal pela prevenção de colites, diminuição no risco de câncer e melhora na imunidade, assim como redução da infecção por patógenos e diarreia, remoção do colesterol, redução de doenças cardiovasculares, prevenção de obesidade e constipação, aumento na absorção de minerais, efeito protetor contra a infecção do trato gastrointestinal, respiratório, urogenital, entre outros (MUSSATTO e MANCILHA, 2007; LAM e CHEUNG, 2013; SLAVIN, 2013).

2.4.1 Os substratos Inulina e Frutoligossacarídeos (FOS)

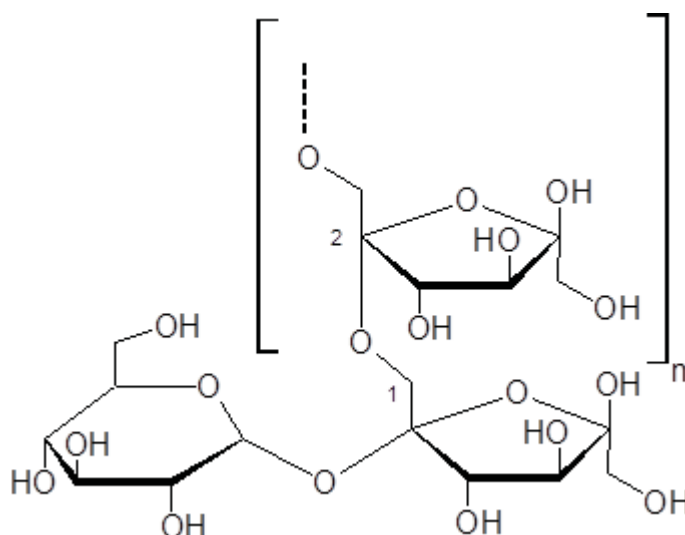
A inulina é um polissacarídeo solúvel em água pertencente ao grupo das frutanas, consiste de uma molécula de sacarose que é alongada por uma cadeia linear com unidades de frutose β -(2 \rightarrow 1)-ligadas. Este polissacarídeo apresenta cerca de 50 a 60 unidades de frutose ligadas (FIGURA 38). A inulina é obtida principalmente a partir de tubérculos (CORRADINI *et al.*, 2004; SAAD, 2006; POMPEI *et al.*, 2008; LICHT *et al.*, 2012).

Os frutoligosacarídeos (FOS) são oligossacarídeos não digeríveis, que apresentam um grau de polimerização de 3 a 10 unidades de frutose e podem ser obtidos a partir do processo de hidrólise química ou enzimática controlada da molécula de inulina, ou por síntese a partir de uma molécula de sacarose e adição enzimática de duas ou três unidades de frutose β -(2 \rightarrow 1)-ligadas à unidade de frutose da molécula de sacarose (CORRADINI *et al.*, 2004; SAAD, 2006; POMPEI *et al.*, 2008; LICHT *et al.*, 2012).

O conceito de oligossacarídeos não digeríveis está relacionado com a anomericidade e tipo de unidade monossacarídica presente na estrutura, de tal forma que as ligações glicosídicas formem produtos que não são substratos para as enzimas do TGI de mamíferos. Por esta razão, passam pelo estômago e intestino proximal, chegando intactos ao cólon, onde se tornam substratos para a microbiota intestinal e promovem a proliferação de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (MUSSATTO e MANCILHA, 2007)

A inulina (FIGURA 42) e os FOS são considerados ingredientes funcionais por influenciarem em certos processos fisiológicos e bioquímicos no organismo, que resultam em melhoria da saúde de maneira geral (SAAD, 2006).

FIGURA 42 - ESTRUTURA QUÍMICA DA INULINA



NOTA: n=50-60 unidades de frutose β -(2 \rightarrow 1)-ligadas

FONTE: O autor (2014)

2.5 APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

A dieta está diretamente ligada com a saúde dos seres humanos, e sabe-se que os alimentos contêm alguns componentes que são favoráveis à manutenção ou promoção da saúde e bem-estar. A procura por novas fontes destes compostos impulsionou a pesquisa para o aprofundamento na área de caracterização e extração de compostos bioativos. As algas apresentam-se como uma nova fonte, praticamente ilimitada, de ingredientes funcionais, não pela presença de um composto em particular, mas pela sua ampla diversidade e possibilidade de cultivo em diferentes condições, o que pode levar ao enriquecimento de alguns bioativos (PLAZA *et al.*, 2010).

Os ingredientes bioativos, capazes de melhorar a saúde do indivíduo, são conhecidos como ingredientes funcionais e podem, de acordo com pesquisas, estar presentes em micro e macroalgas. Estas, por sua vez, seriam novas fontes naturais destes compostos, podendo vir a se tornar parte do hábito alimentar, ou mesmo, terem seus compostos extraídos para formulação de alimentos funcionais ou suplementos (HERRERO *et al.*, 2006; PLAZA *et al.*, 2008; ZUBIA *et al.*, 2009).

Por definição, alimento funcional é aquele que contém um ou mais ingredientes funcionais, que estão ausentes no alimento similar convencional, ou em concentrações mais baixas. Já os suplementos alimentares são aqueles comercializados em pílulas ou tabletes, que contêm esses ingredientes capazes de melhorar a saúde. No contexto de formulação de alimentos funcionais ou suplementos, preferem-se fontes naturais, como plantas e algas, aos compostos sintéticos (PLAZA, *et al.*, 2008; ZUBIA *et al.*, 2009).

Ao longo dos últimos anos muitos produtos probióticos têm sido desenvolvidos com o objetivo de promover saúde, embora esta área apresente uma difícil problemática em relação ao controle da viabilidade dos produtos. Quando probióticos são incorporados em produtos alimentares, a viabilidade da cultura frequentemente diminui como resultado da redução do pH, diminuição na temperatura, inadequação de nutrientes e estresse oxidativo (LAM e CHEUNG, 2013). A condição anaeróbia da maior parte das bactérias é um fator fundamental na manutenção das células viáveis no momento do consumo. Por isso, têm-se explorado estratégias para proteger as bactérias dos efeitos deletérios do oxigênio,

uma delas é a utilização de ácido ascórbico como um redutor do O₂ em iogurtes (QUIGLEY, 2010). O desenvolvimento de produtos com compostos prebióticos apresentam-se como uma alternativa à dificuldade de produzir novos produtos com células viáveis de cepas probióticas. Estes desafios têm sido superados pela adição de prebióticos em formulações de produtos alimentares, produtos conhecidos como simbióticos, onde há uma mistura de pro e prebióticos (MUSSATTO e MANCILHA, 2007; MADHUKUMAR e MURALIKRISHNA, 2010).

Segundo BIGLIARDI e GALATI (2013) as β -glucanas de cereais como aveia, cevada e centeio, são um dos principais tipos de alimento funcional disponíveis no mercado como substratos fermentáveis para o crescimento de microrganismos probióticos como bifidobactérias e lactobacillus presentes no cólon.

2.6 USOS DE INTERESSE GERAIS DE PREBIÓTICOS

Muitos surtos alimentares tem sido associados a ingestão de alimentos de origem animal contaminados. Como discutido no capítulo anterior, os antibióticos foram incluídos na alimentação animal, atuando como promotores de crescimento. No entanto, uma preocupação mundial pelo desenvolvimento de bactérias resistentes e a transferência de genes de resistência a antibióticos levou a proibição do uso de antibióticos pela União Européia desde 2006. Visto que o primeiro objetivo da pecuária é a entrega de alimentos seguros para humanos, tanto probióticos como prebióticos e simbióticos têm sido utilizados em produtos especificamente destinados à saúde animal. Os principais efeitos destes aditivos alimentares são o aumento da resistência à colonização por bactérias patogênicas e estimulação da imunidade da mucosa resultando, assim, numa carga reduzida de patógenos, melhoria da saúde dos animais e, consequentemente, reduzindo o risco de contaminação por alimentos de origem animal (GAGGIA *et al.*, 2010).

Na prática clínica (em humanos), o uso de probióticos é muito difundido em pacientes acometidos por diarreia causada por infecção aguda ou pelo uso de antibióticos, assim como em pessoas com câncer em que os medicamentos usados para o tratamento, muitas vezes, podem desencadear uma diarreia aguda. Entretanto, pessoas com câncer, por exemplo, frequentemente estão imunocomprometidas e, nesses casos, a administração microrganismos vivos, como

é o caso dos probióticos pode apresentar efeitos adversos, como bacteremia (REDMAN *et al.*, 2014). Tem sido proposto que os probióticos podem influenciar favoravelmente o curso de pacientes criticamente enfermos. Entretanto de acordo com KORETZ (2009), não está claro se eles são benéficos. Portanto, acredita-se que a terapia com prebióticos seria mais segura, uma vez que permitiria à microbiota resistente presente no TGI multiplicar-se na presença de maior concentração de sustratos adequados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIOTICA DOS EXTRATOS DE *P. lutheri* E *P. gyrans*

O protocolo para avaliação da atividade prebiótica foi desenvolvido baseado nos métodos descritos por MADHUKUMAR e MURALIKRISHNA (2010) e GRIMOUD *et al.* (2010). Foram realizados testes de crescimento da bactéria *in vitro*, onde o consumo dos polissacarídeos pela bactéria foi avaliado por meio da análise de densidade óptica a 600 nm conforme descrito a seguir.

3.1.1 Microrganismo e condições de cultura

Para os estudos de determinação da atividade prebiótica, foi utilizada a bactéria *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, obtida do ARS (*Agriculture Research Service*, USA) Coleção de Culturas. A bactéria liofilizada foi reativada em 5 mL de caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe), suplementado com cisteína-HCl (0,05 % m/v) e mantido em estufa a 37 °C por 72 h. A adição de cisteína-HCl mostrou-se fundamental para o crescimento da bactéria, pelo auxílio na redução do oxigênio dissolvido no meio. Na sequência, parte da cultura foi preparada para ser congelada em caldo MRS-cisteína contendo 10 % (v/v) de glicerol. A outra parte foi plaqueada em ágar (1,5 % m/v) MRS-cisteína (adicionado de azul de anilina 0,02 % (m/v)) para ser testada quanto a sua capacidade de crescimento em meio aeróbio e anaeróbio, visto tratar-se de espécie anaeróbia facultativa. A atmosfera anaeróbia para placas

de Petri foi obtida por meio de kits de anaerobiose Anaerolcult P (Merck). Uma vez determinado que o crescimento da bactéria foi independente da atmosfera anaeróbica, optou-se pelo crescimento em aerobiose como rotina.

O estoque de bactéria foi mantido a -20 °C e resuspenso em caldo MRS-cisteína e mantidas a 37 °C para realização dos testes. A reativação das bactérias congeladas foi realizada por meio de 5 repiques consecutivos a cada 48 h, após centrifugação (10000 rpm por 15 min) o meio antigo foi descartado e o pellet bacteriano resuspenso em novo caldo.

3.1.2 Curva de calibração e determinação da densidade óptica do inóculo

Inicialmente foram realizadas curvas padrão das bactérias, crescidas em caldo MRS-cisteína, durante 24 e 48 h a 37 °C, com diferentes valores de densidade óptica (OD) inicial, 0,1, 0,5 e 1 a partir das quais foram feitas diluições sucessivas em caldo MRS-cisteína. De cada diluição, 1 mL foi utilizado para plaqueamento e 0,2 mL para a leitura da OD (sextuplicata).

O plaqueamento realizado foi tipo *pour plate* em placas de Petri (triplicata) seguido de incubação a 37 °C durante 48 h. Ao final, foi realizada contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por placa de Petri, naquelas diluições em que isso foi possível, ou seja, que a concentração do inóculo não foi suficiente para tomar a placa. A leitura da OD foi feita em leitora de microplacas a cada 30 min em 600 nm, durante 48 h a 37 °C.

Esse procedimento é importante, pois permite a relação direta entre densidade óptica e unidades formadoras de colônia (OD x UFC), além de estabelecer o limite de detecção do equipamento.

3.1.3 Inóculo

A cepa foi cultivada durante 24 h a 37 °C em caldo MRS suplementado com cisteína-HCl (0,05 % m/v). A suspensão bacteriana teve sua OD ajustada para 0,01 a 600 nm, com base nos resultados obtidos no experimento anterior.

3.1.4 Princípio do método e ensaio

O objetivo desta metodologia foi avaliar o crescimento da bactéria *L. acidophilus* na presença de diferentes fontes de carbono. A maior parte dos métodos descritos para medir a atividade prebiótica é realizada em fermentadores de bancada ou maiores, o que implica num grande volume e a necessidade de grandes quantidades de amostra. Por esse motivo, buscou-se desenvolver um método adaptado para microplacas.

Inicialmente, foi formulado o meio basal (composição descrita no QUADRO 4), sem adição de extrato de carne, extrato de levedura, acetato de sódio e dextrose, com base na formulação do caldo MRS comercial. Meio basal adicionado de inulina (Orafti) 0,25 % (m/v) como fonte de carbono principal, controle positivo, (visto sua já descrita capacidade de ser fermentado por bactérias probióticas). Meio teste: as amostras foram preparadas em meio basal, adicionado apenas dos extratos de microalgas a serem testados 0,25 % (m/v). Além disso, as curvas de crescimento do microrganismo, nessas condições, foram comparadas ao crescimento quando em caldo MRS comercial. A concentração 0,25 % (m/v) para inulina e extratos foi determinada com base em experimentos realizados com inulina em meio basal nas concentrações de 0,25, 1 e 2 % (m/v).

QUADRO 4 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA

Componentes^a	Basal	Controle Positivo	Teste
Cisteína	0,05 %	0,05 %	0,05 %
Componentes^a	Basal	Controle Positivo	Teste
Triptona	10	10	10
Citrato de amônia	2	2	2
Sulfato de magnésio	0,10	0,10	0,10
Sulfato de manganês	0,05	0,05	0,05
Fosfato dipotássio	2	2	2
Polisorbato 80	2	2	2
Inulina	-	0,25 %	-
Extrato de microalgas	-	-	0,25 %

NOTA: ^a A concentração dos componentes é dada em g/L exceto polisorbato em mL/L, cisteína, inulina e extratos em m/v.

Testes preliminares com inulina e os extratos sem tratamento de esterilização mostraram que houve crescimento nos controles de contaminação. O tratamento usual de esterilização para estes testes é feito por meio de filtração em membrana de 0.22 µm. Entretanto, como foi observado a baixa solubilidade em água de boa parte dos extratos, foram realizados testes de esterilização com inulina e os extratos. Estes foram monitorados por análise de RMN a fim de verificar a possibilidade de degradação das moléculas de interesse. Descartada a degradação térmica, optou-se pelo preparo da inulina e extratos para o teste por meio de esterilização em autoclave a 121 °C durante 15 min. Tanto inulina quanto extratos (5 mg) foram, então, solubilizados (em tubos falcon) em 1 mL de água, autoclavados (121 °C por 15 min) e adicionados de 1 mL de meio basal em ambiente estéril de fluxo laminar (concentração final 0,25 % m/v).

Observado que o meio basal é utilizado para diluir em 50 % o volume de inulina e extratos, é importante destacar que ele foi preparado de acordo com a composição do QUADRO 4 e solubilizado na metade do volume total necessário, calculado de acordo com o número de amostras, controle positivo e controle de contaminação.

Após diluição das soluções de extrato e inulina com meio basal, 1 mL desta solução foi reservada em tubos eppendorfes, para realizar os controles de contaminação (onde não foi adicionado suspensão bacteriana). Esse controle é útil na garantia de que as curvas de crescimento observadas não são provenientes de possível contaminação prévia do meio ou da inulina e extratos testados.

Teste de crescimento: 1 mL foi adicionado 0,1 mL (10 %) de suspensão bacteriana na OD 0,01 e vortexado.

Em microplacas de 96 poços simples foram plaqueados em triplicata 200 µL de meio basal teste (meio basal adicionado dos extratos a serem testados), controle positivo (meio basal adicionado de inulina), e meio MRS-cisteína, todos inoculados com *L. acidophilus*. Na sequência, foi feito o plaqueamento dos controles de contaminação: meio basal teste (meio basal adicionado dos extratos a serem testados), controle positivo (meio basal adicionado de inulina), e meio MRS-cisteína sem serem inoculados. Em todos os poços foi adicionada uma gota de vaselina líquida com intuito de impedir a perda por evaporação.

A microplaca foi incubada a 37 °C em leitora de microplaca SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices), para monitoramento do crescimento a 600 nm a cada 30 min por até 48 h. Foram realizados 3 experimentos independentes.

Tubos falcon, ependorfes, e todo o material descartável utilizado no teste foi previamente autoclavado (121 °C por 15 min), juntamente com as soluções utilizadas no teste: meio basal, meio MRS-cisteína, inulina e extratos.

3.1.5 Análise dos resultados

As curvas de crescimento obtidas para os extratos de microalgas testados foram comparadas ao controle positivo (inulina). Visto que muitos extratos apresentaram cor, a densidade óptica inicial destes foi maior que a da inulina (incolor). Essa fonte de erro nas análises foi minimizada pela análise da variação entre a densidade óptica inicial (tempo = 0 h) e a OD final (tempo = 48 h), que consiste efetivamente na capacidade da bactéria em utilizar as fontes de carbono disponíveis. Variações próximas a zero indicam baixa ou nenhum crescimento bacteriano, variações maiores ou iguais a variação detectada no controle positivo indicam potencial prebiótico.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo programa Minitab versão 17.1.0 utilizando ANOVA. Para comparação de médias foi utilizado o teste de mínima diferença significativa (LSD) de Fisher, com nível de significância de 95 %.

3.1.6 Análise da diminuição de pH

Os extratos que apresentaram maior potencial prebiótico de acordo com a análise da cinética de crescimento foram submetidos a novo cultivo para avaliação da variação do pH. Foram utilizadas as mesmas condições de cultivo: inulina e extratos: 0,25 % m/v, inóculo: 10 % de solução OD inicial 0,01, crescimento a 37 °C em estufa bacteriológica durante 48 h, triplicata, em volume maior (5 mL). Para a determinação do pH foi utilizado o pHmetro digital Gehaka PG1800. A diminuição do pH nas culturas com extratos de microalgas foram comparadas a culturas do meio basal, meio contendo inulina e meio MRS. Os resultados foram expressos como a variação entre o pH depois de 48 h de crescimento e no tempo zero. A análise

estatística foi realizada utilizando ANOVA e teste de Tukey para comparação das médias do pH final, com nível de significância de 95 %.

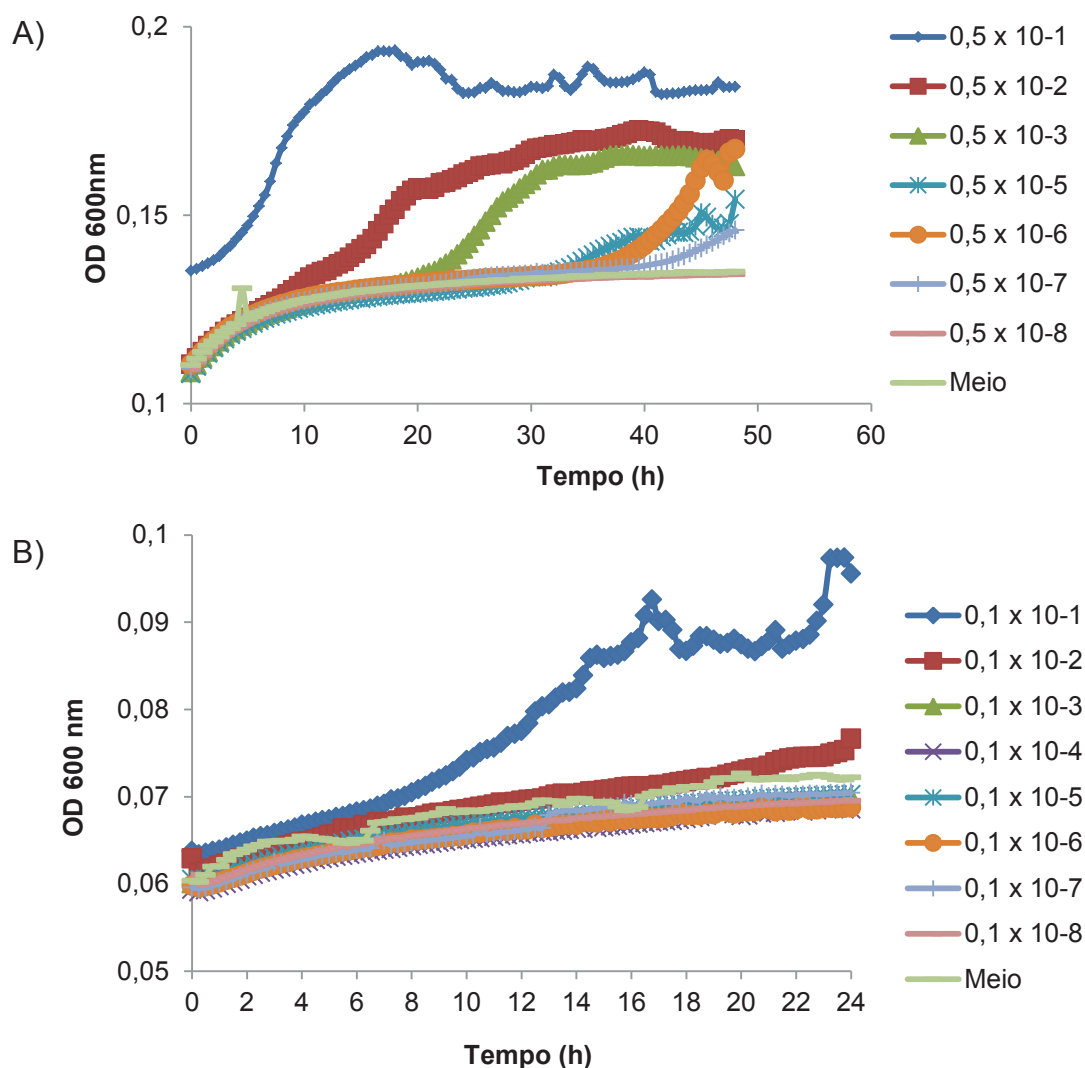
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA A PARTIR DA ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO

4.1.1 Definição da concentração de inóculo

A primeira etapa do desenvolvimento do protocolo consistiu na determinação da OD do inóculo (*L. acidophilus*) a ser utilizado nos testes. Para isso, foi necessário elaborar uma curva padrão com uma série de diluições. No primeiro experimento foi realizada uma curva (FIGURA 43 A) a partir de solução com OD 0,1 e demais suspensões $0,1 \times 10^{-1}$, $0,1 \times 10^{-2}$ e assim por diante, até diluição 10^{-8} . No primeiro experimento o tempo de incubação foi de 24 h a 37 °C com medida de OD a cada 15 min.

Nessa curva não foi possível observar o crescimento diferencial esperado entre as diferentes diluições e o meio apenas (sem inóculo). Todas as diluições, exceto a mais concentrada $0,1 \times 10^{-1}$, apresentaram praticamente curvas sobrepostas, o que indicou que, possivelmente, estas diluições estavam fora do limite detectável pelo equipamento.

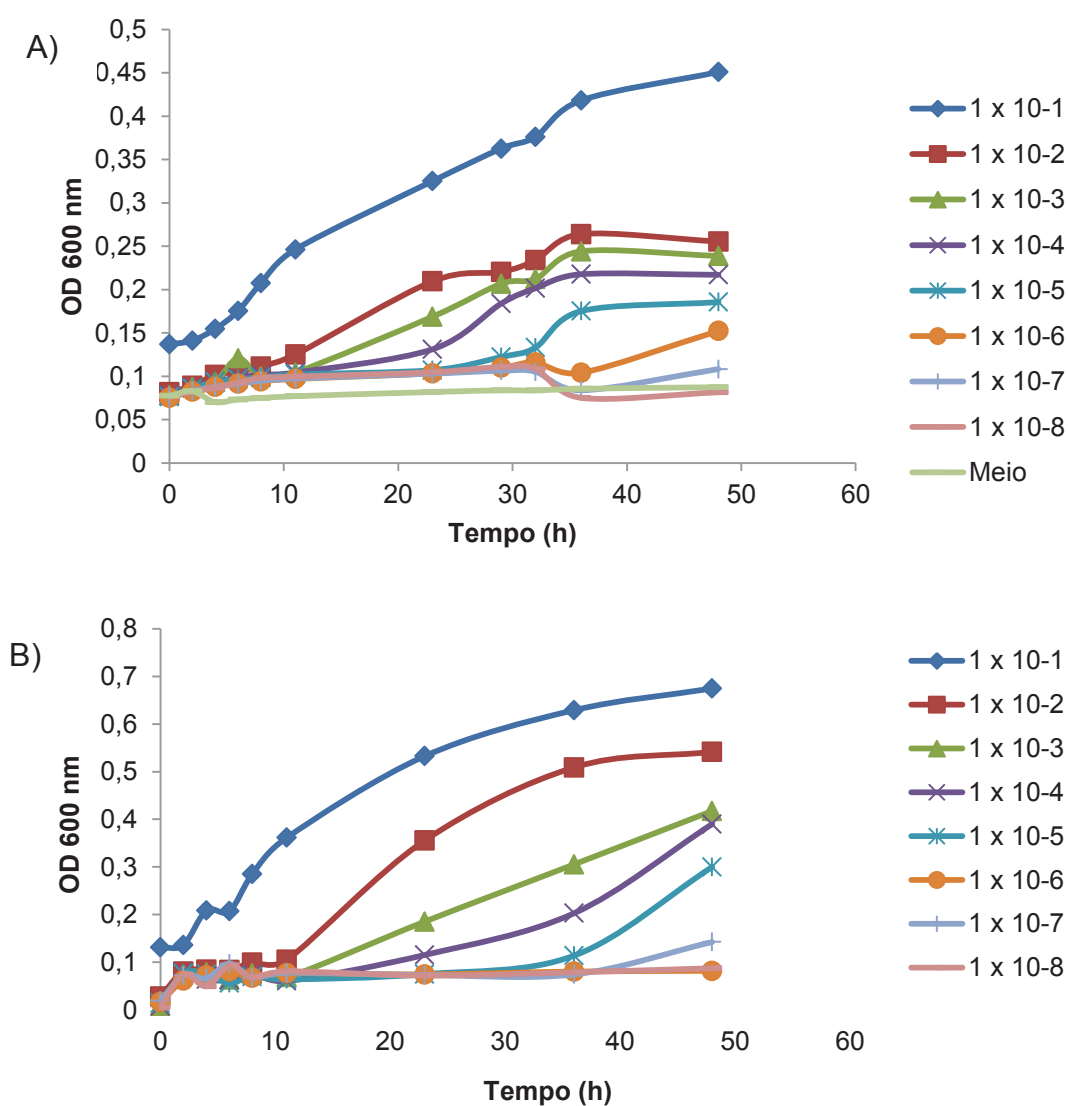
FIGURA 43 - CURVA PADRÃO DE *L. acidophilus* OD INICIAL 0,1 (A) E OD INICIAL 0,5 (B)

A partir desse resultado foi elaborada uma nova curva (FIGURA 43 B), partindo de uma OD inicial de 0,5. O tempo de incubação também foi alterado para 48 h (com intuito de visualizar todas as fases, lag, exponencial e estacionaria), uma vez que o experimento foi acompanhado por apenas 24 horas.

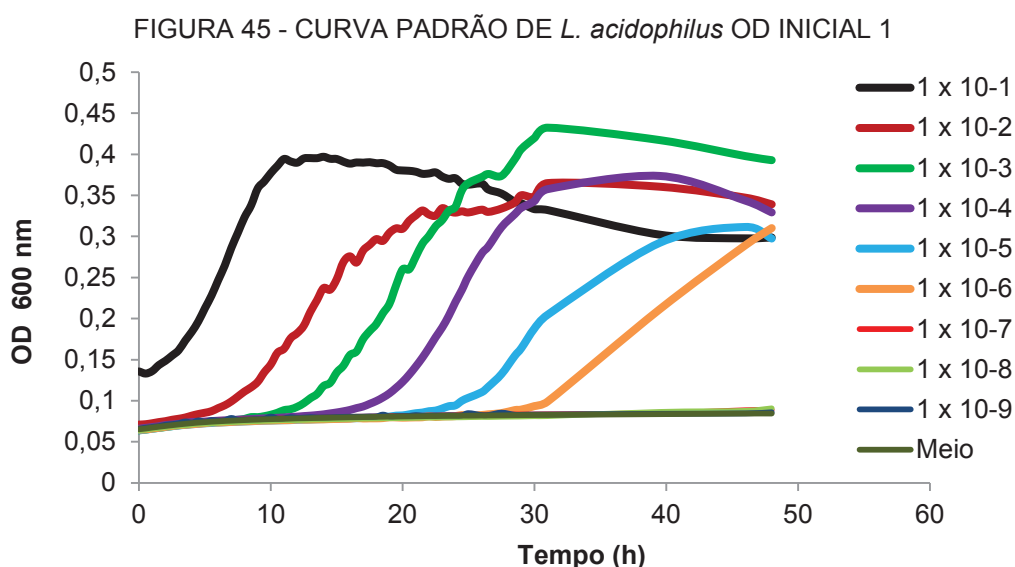
A OD inicial maior fez com que fosse possível verificar maior diferença no crescimento entre as diluições, entretanto todas as séries a partir de $0,5 \times 10^{-5}$ se sobrepuseram a curva do controle (meio), indicando que concentração de células ainda não era suficientemente detectável pelo equipamento. Esse resultado gerou ainda a dúvida de que as bactérias poderiam não estar se desenvolvendo adequadamente nas microplacas, talvez pelo excesso de oxigênio devido ao fato

das placas serem incubadas sem tampa no equipamento. Entretanto, o crescimento era claramente observável durante a fase de reativação das bactérias em ependorfes. Para maiores esclarecimentos, um novo experimento foi modelado, onde as curvas foram iniciadas com OD 1, e as microplacas incubadas em anaerobiose à 37 °C em estufa bacteriológica. Foram realizadas onze leituras pontuais da OD (FIGURA 44 A). Em paralelo com culturas mantidas em ependorfes (triplicata) (FIGURA 44 B), a partir das mesmas diluições seriadas plaqueadas em microplacas, com leitura da OD realizada no mesmo tempo da microplaca.

FIGURA 44 - CURVA PADRÃO DE *L. acidophilus* OD INICIAL 1 EM MICROPLACAS MANTIDAS EM ANAEROBIOSE (A) E EM EPENDORFES (B)



Nas curvas de crescimento de *L. acidophilus* obtidas a partir de uma suspensão bacteriana de OD inicial 1 é muito clara a diferença entre as diluições, tanto da microplaca mantida em anaerobiose, quanto das culturas crescidas em ambiente aeróbio. Portanto, a partir deste resultado observou-se que a densidade celular inicial foi mais significativa para o crescimento bacteriano que o ambiente, aeróbio ou não, ao que a mesma foi exposta. Para confirmar essa hipótese a curva com OD inicial 1 foi repetida nas mesmas condições dos experimentos anteriores, sendo mantida incubada no equipamento para cinética de crescimento a 37 °C durante 48 h (FIGURA 45).



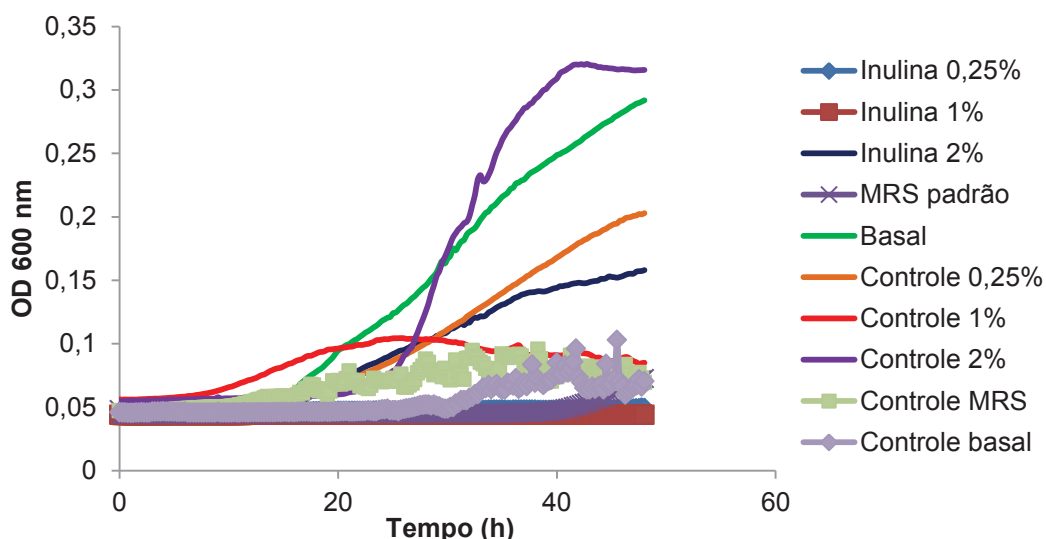
A FIGURA 45 apresenta as curvas de crescimento das diluições seriadas, em que se pode observar o crescimento bacteriano até a diluição 10^{-6} . As diluições seguintes se sobrepõem à OD do controle do meio de cultura, indicando que não há células viáveis. Esses dados foram confirmados pela contagem de UFC em placas de Petri, onde nas diluições 10^{-1} a 10^{-4} não foi possível realizar a contagem, devido a elevada concentração de colônias. Na diluição 10^{-5} foram contadas em média 140 UFC, 10^{-6} - 14 UFC e 10^{-7} - 1 UFC, nas diluições subsequentes não houve crescimento de nenhuma UFC. Também foi possível constatar que quanto mais diluída a suspensão bacteriana maior o tempo de fase lag, chegando a levar cerca de 30 h para o início da fase exponencial na diluição 10^{-6} , enquanto na diluição 10^{-1} a fase exponencial é visível na primeira hora de cultivo. A partir desse experimento,

foi determinado que 0,1 mL de uma suspensão bacteriana de OD 0,01 seria utilizado como inóculo para os testes de fermentação, sendo adicionado em 1 mL de meio basal contendo os extratos microalgais (concentração final de bactérias 1×10^{-3} , ou seja, OD 0,001).

4.1.2 Tratamento do padrão de inulina e das frações microalgais

No primeiro teste realizado com diferentes concentrações de inulina, a fim de se estabelecer a concentração a ser utilizada nos testes posteriores, nenhum tratamento de esterilização foi aplicado ao polissacarídeo padrão. Nas curvas de crescimento (FIGURA 46) verifica-se que os meios de controle de crescimento contendo inulina, ou seja, sem adição de inóculo, tiveram crescimento maior que os demais. Esse resultado indicou que a inulina apresentava contaminação bacteriana, visto que o controle do meio basal e mesmo o controle do meio MRS não estimularam o crescimento bacteriano.

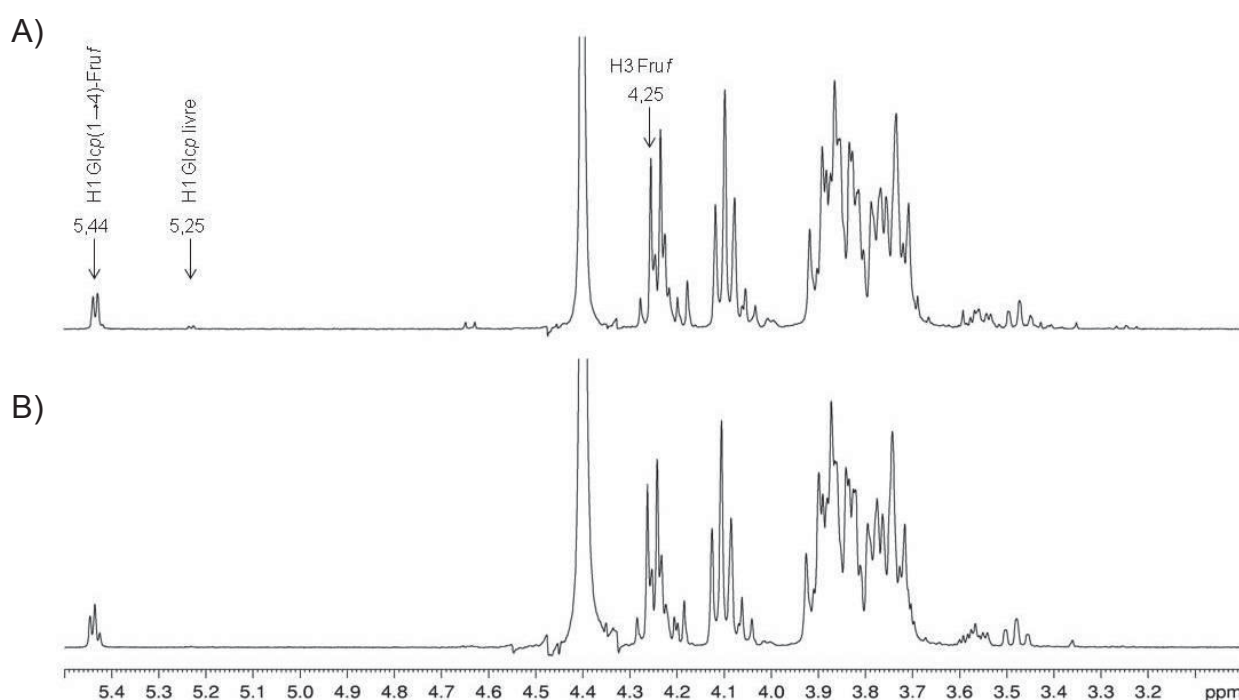
FIGURA 46 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *L. acidophilus* NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INULINA E CONTROLES DE CRESCIMENTO



De acordo com o resultado obtido, fez-se necessário estabelecer uma estratégia de esterilização para a inulina, que fosse aplicável aos demais extratos de microalgas com os quais foi feita a comparação. É comum que a inulina seja esterelizada por meio da filtração em membranas de 0,22 μm , entretanto, essa

estratégia não seria adequada para os extratos de microalgas, uma vez que esses apresentam menor solubilidade em água e a maior parte das moléculas ficaria retida no filtro. Por esse motivo, a inulina e duas frações microalgais, (PGAQ-S e PGAL-P, (representantes dos extratos aquosos e alcalinos, respectivamente), foram solubilizadas em água e submetidas à autoclavagem (121 °C por 15 min), para, então, serem analisadas por RMN de ^1H (FIGURA 47) a fim de verificar uma possível degradação dessas moléculas. Sabe-se que a inulina é estável em soluções aquosas a temperatura ambiente e pH neutro. No entanto, em altas temperaturas e na presença de ácido a hidrólise da inulina pode tornar-se significativa levando a eventual decomposição do polímero (BARCLAY *et al.*, 2012). Por esse motivo, o pH da solução de inulina preparada para autoclavagem (10 mg/mL) foi medido apresentando-se neutro.

FIGURA 47 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO PADRÃO DE INULINA SEM NENHUM TRATAMENTO (A) E ESTERILIZADO (121°C POR 15 min) (B)



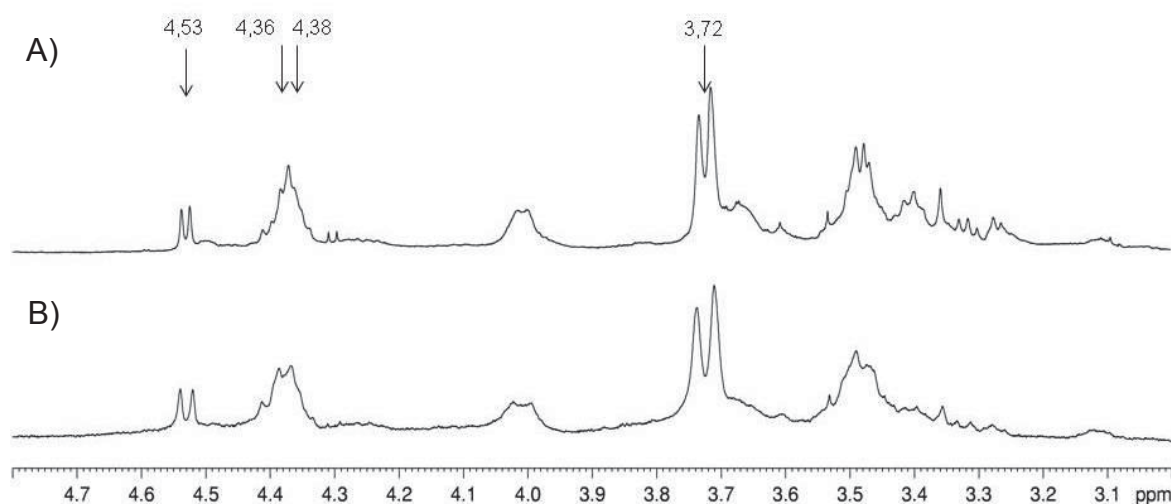
NOTA: Solvente D_2O , Temperatura 60 °C

De acordo com BARCLAY *et al.* (2012), a hidrólise da inulina pode ser observada em espectros de RMN de ^1H , principalmente, pela diminuição da intensidade dos sinais de H-1 da unidade de glucose ligada (em ~ 5,44 ppm) e H-3

da frutose ($\sim 4,25$ ppm), seguido do aparecimento de um sinal em $\sim 5,25$ ppm correspondente ao H-1 dos monômeros de α -glucose livre. Quando se compara o espectro da inulina nativa (sem tratamento) (FIGURA 47 A) com o espectro da inulina submetida à esterlização (FIGURA 47 B), observa-se que o sinal em 5,25 ppm, atribuído ao H-1 de unidades de glucose livre, aparece justamente no espectro da inulina nativa e não da esterilizada como seria esperado devido a uma possível degradação pela alta temperatura. Também se observa um sinal em aproximadamente 4,64 ppm, que devido a alta constante de acoplamento 7,4 Hz pode ser atribuído aos anomeros β da glucose livre. Tais sinais quando presentes na fração nativa podem ser referentes à presença de glucose livre proveniente da própria extração do vegetal utilizado como fonte. O desaparecimento desses sinais na fração esterilizada indica que a glucose livre foi degradada, sem degradar, entretanto o polímero de inulina.

De acordo com a composição química dos extratos apresentada no CAPÍTULO 1, as frações não são compostas por moléculas lábeis a temperatura, entretanto uma representante de cada fração, aquosa (PGAQ-S) e alcalina (PGAL-P), foi escolhida para ser submetida ao mesmo processo (FIGURAS 48 e 49).

FIGURA 48 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PGAQ-S SEM NENHUM TRATAMENTO (A) E ESTERILIZADA (121°C POR 15 MIN) (B)



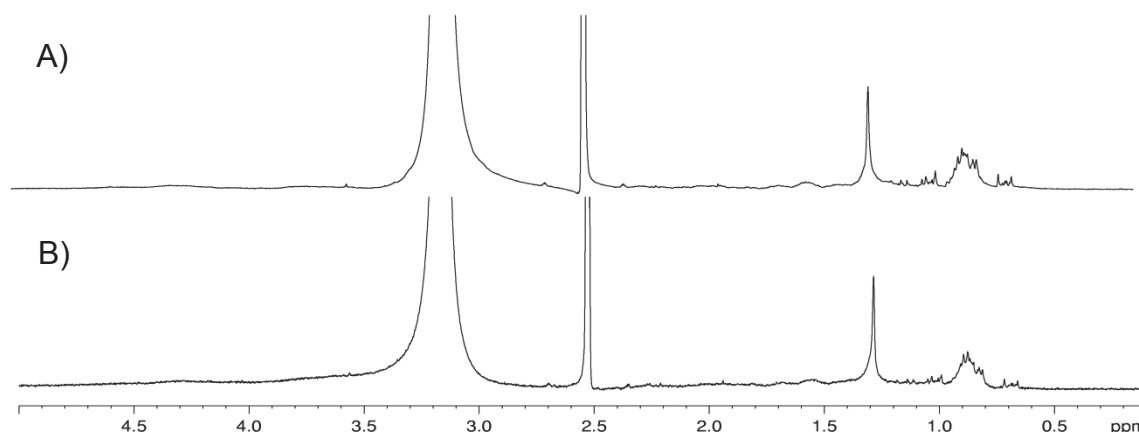
NOTA: Solvente DMSO, Temperatura 70°C

A fração PGAQ-S submetida à autoclavagem apresentou espectro (FIGURA 48 B) muito semelhante a fração nativa (FIGURA 48 A), observa-se pelos sinais de

H-1 da unidade de glucose β -(1 \rightarrow 3)-ligada em 4,36 ppm e TNR de glucose em 4,38 ppm, H-1 em 4,53 e H-6 em 3,72 ppm da unidade de glucose disubstituída.

Com relação ao espectro da fração alcalina PGAL-P (FIGURA 49), também foi observado que o tratamento de autoclavagem não promove mudanças na estrutura da molécula. Essa fração é majoritariamente composta de proteínas e embora não tenha apresentado sinais na região caracterísitca de carboidratos (entre 3 e 5 ppm aproximadamente) os espectros da fração nativa e autoclavada são muito semelhantes.

FIGURA 49 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO PGAL-P SEM TRATAMENTO (A) E ESTERILIZADA (121 °C POR 15 MIN) (B)

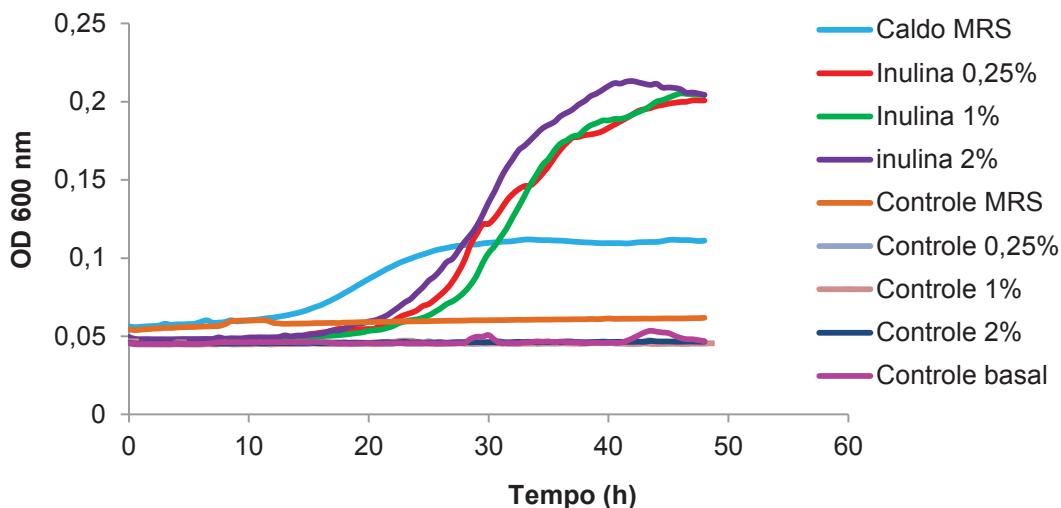


NOTA: Solvente DMSO, Temperatura 70 °C

Os resultados confirmaram que nem o padrão de inulina nem as frações utilizadas no teste são susceptíveis à degradação pela esterlização. Dessa forma, a esterlização por autoclavagem foi escolhida como pré tratamento das amostras e do padrão de inulina.

Determinado o procedimento de esterlização, foi realizado novo ensaio com as três concentrações de inulina (controle 0,25, 1 e 2 %) (FIGURA 50). Assim, a esterlização foi efetiva para o padrão, uma vez que não houve crescimento em nenhum dos controles. Os quais apresentaram linhas contínuas e sobrepostas. Além disso, foi possível observar que todas as concentrações do meio basal suplementado com inulina apresentaram crescimento superior ao da bactéria inoculada em meio MRS comercial.

FIGURA 50 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *L. acidophilus* NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INULINA AUTOCLAVADA E CONTROLES DE CRESCIMENTO



A partir dos resultados desse experimento (FIGURA 50), foi possível determinar a concentração de inulina a ser utilizada nos testes como controle positivo, mesma concentração a ser utilizada para amostras que foram avaliadas quanto ao seu potencial prebiótico. Visto que as três concentrações apresentaram curvas muito semelhantes, optou-se por empregar a menor concentração (0,25 %), uma vez que isso implica numa menor quantidade de amostra para os testes.

Todos os resultados apresentados até o momento fizeram parte de um processo de estabelecimento do protocolo para teste dos extratos microalgais. A partir destes, foram determinadas as principais características do teste: OD inicial do inóculo 0,01, a concentração do padrão utilizado como controle positivo 0,25 % (a mesma das amostras), esterilização (em autoclave 121 °C, 15 min) de padrão e amostras, cultivo em aerobiose durante 48 h a 37 °C.

Na sequência serão apresentados os resultados obtidos para avaliação da atividade prebiótica das frações obtidas das microalgas marinhas *P. gyrans* e *P. lutheri*.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA DOS EXTRATOS DE MICROALGAS

A fim de verificar o comportamento de *L. acidophilus* em diferentes frações obtidas de microalgas, foi realizada análise da cinética do crescimento. Na TABELA

13 são apresentados os dados relacionados à diferença entre a OD final e inicial em cada uma das frações testadas (média da variação de OD de três experimentos independentes), onde valores maiores indicam maior potencial de crescimento.

TABELA 13 - VARIAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA DE *L. acidophilus* EM DIFERENTES EXTRATOS DE MICROALGAS

Amostra	Média da Δ OD 600 nm	Desvio Padrão
PGAQ-S	0,664 ^A	±0,35
PGAL-SE	0,461 ^B	±0,29
PLAL-S	0,371 ^{B,C}	±0,27
PLAQ-S	0,311 ^{B,C,D}	±0,37
PLAL-SE	0,278 ^{B,C,D,E}	±0,17
PGAL-S	0,265 ^{B,C,D,E,F}	±0,41
PGAQ-SE	0,183 ^{C,D,E,F,G}	±0,26
INULINA (Controle Positivo)	0,171 ^{D,E,F,G}	±0,20
PLAQ-SE	0,123 ^{D,E,F,G}	±0,18
PGAL-P	0,091 ^{E,F,G}	±0,14
PLAQ-P	0,032 ^{F,G}	±0,04
PLAL-P	0,028 ^{F,G}	±0,05
PGAQ-P	0,013 ^G	±0,02

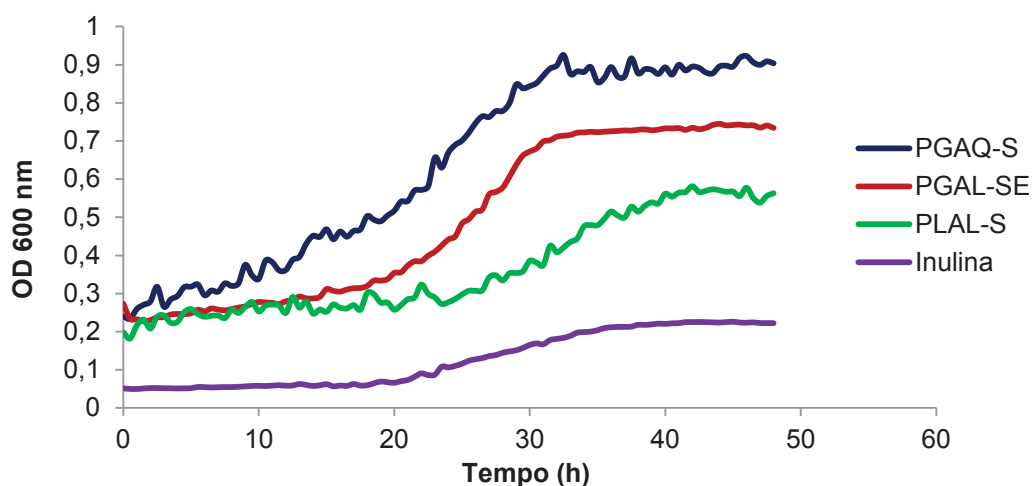
NOTA: os níveis que compartilham uma letra não são significativamente diferentes. Por outro lado, se eles não compartilharem uma letra, as médias de nível serão significativamente diferentes. ($P < 0,05$).

Os resultados obtidos para as frações PGAQ-S, PGAL-SE e PLAL-S destacaram-se das demais por terem provido condições de crescimento de *L. acidophilus* significativamente superior ao meio suplementado com inulina (controle positivo) (FIGURA 51). As demais frações foram consideradas estatisticamente iguais ao controle positivo, o que também indica alto potencial dos extratos de ambas as microalgas de serem fermentados pela bactéria *L. acidophilus*.

O crescimento no meio contendo PGAQ-S partiu de uma OD inicial ~0,3 e alcançou uma OD final ~0,9, levando a uma variação de cerca de 0,6 na OD, a maior variação observada entre todos os extratos testados, seguida da variação de cerca de 0,4 observada para a fração PGAL-SE e aproximadamente 0,3 para o meio contendo a fração PLAL-S. Essas variações são cerca 6, 4 e 3 vezes maiores,

respectivamente, que o controle positivo, uma vez que as bactérias cultivadas em meio contendo inulina alcançaram uma variação pouco maior que 0,1.

FIGURA 51 - CURVAS DE CRESCIMENTO DE *L. acidophilus* EM MEIO BASAL SUPLEMENTADO COM INULINA OU AS FRAÇÕES PGAQ-S, PGAL-SE, PLAL-S



É possível observar uma tendência onde as maiores variações na OD foram observadas nas frações alcalina ou aquosas, solúveis no tratamento por gelo-degelo e nas frações provenientes de sobrenadantes etanólicos (sufixo SE). De forma similar, variações mais próximas a zero, ou seja, que propiciaram menos condições de crescimento da bactéria foram as amostras aquosas e alcalinas AQ-P e AL-P (precipitadas em gelo-degelo) de ambas as microalgas *P. gyrans* e *P. lutheri*. Baseado nessas observações, acredita-se que, embora muitas frações tenham sido consideradas estatisticamente iguais ao controle, as frações solúveis em gelo-degelo e os sobrenadante etanólico são as que propiciam as melhores condições de crescimento a bactéria *L. acidophilus*.

As frações aquosas solúveis em gelo-degelo, PGAQ-S e PLAQ-S, por exemplo, apresentam algumas características em comum, são majoritariamente compostas por β -glucanas ramificadas (1 \rightarrow 3,6)-ligadas. Enquanto as frações aquosas precipitadas no tratamento de gelo-degelo, PGAQ-P e PLAQ-P, são compostas por glucanas lineares β -(1 \rightarrow 3)-ligadas. As características químicas das moléculas que compõem os extratos parecem ter importante influência sobre a capacidade de *L. acidophilus* de crescer nesses meios. Esses dados revelam que a

presença de frações com elevados teores de glucanas ramificadas no meio de cultura apresenta melhor efeito no crescimento de *L. acidophilus* que frações contendo altos conteúdos de glucanas lineares.

Esse efeito foi também verificado por KUDA *et al.* (2009), que analisaram os efeitos de laminaranas (β -glucanas ramificadas (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-ligadas obtidas de macroalgas marinhas), paramylon e curdlan (β -glucanas lineares (1 \rightarrow 3)-ligadas obtidas de microalga e bactéria respectivamente). Foi observado que a fermentação *in vitro* de laminaranas pela microflora fecal de humanos apresentou uma variação na OD de 1,4 em relação ao controle, enquanto a fermentação de paramylon e curdlan não promoveu variação de OD. Os mesmos resultados foram obtidos *in vivo*, onde o tratamento de ratos com laminaranas promoveu um aumento no peso do conteúdo do ceco (primeira parte do intestino grosso), enquanto o tratamento com paramylon promoveu apenas um aumento no peso das fezes dos animais, o que indica que não foi fermentada pela microbiota. Glucanas β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-ligadas obtidas de fungos também demonstraram capacidade de promover o crescimento bacteriano de probióticos dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* *in vitro*. De acordo com SNART *et al.* (2006), a suplementação da dieta de ratos com β -glucanas de alta viscosidade, obtidas de cevada, resultou num aumento da quantidade de *L. acidophilus* presentes no ceco. O fato das glucanas lineares serem fontes menos propícias de energia para os microrganismos pode estar relacionado com a insolubilidade dessas moléculas (ZHAO e CHEUNG, 2013). Para as moléculas testadas neste trabalho, esta afirmação é razoável uma vez que as glucanas lineares concentraram-se nas frações precipitadas do tratamento em gelo-degelo, indicando a maior insolubilidade.

Um estudo realizado com oligossacarídeos obtidos a partir de β -glucanas de aveia mostrou que, entre as cepas probióticas testadas, a bactéria com maior capacidade de degradar essas moléculas foi *L. rhamnosus*. Houve uma taxa de crescimento seis vezes maior que *L. acidophilus*, indicando uma diferença no aparato enzimático exibido por cada uma das espécies e necessário para a degradação de ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) (JASKARI *et al.*, 1998). Esses dados corroboram a afirmação de MURPHY *et al.* (2013), onde embora os *Lactobacillus* possam utilizar uma ampla variedade de carboidratos, pode haver uma variação significativa entre as espécies.

Segundo RUSSO *et al.* (2012), o EPS (exopolissacarídeo - β -glucana (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 2)) produzido por uma bactéria ácido-láctica *Pediococcus parvulus* foi capaz de modular positivamente o crescimento de cepas de *L. plantarum* geneticamente modificadas (para maior expressão e β -glucosidases) de *L. acidophilus*. Em particular, a disponibilidade de ambos D-glucose e EPS estenderam a fase logarítmica de ambas as cepas, possivelmente devido a glucose ser utilizada como fonte imediata e EPS uma fonte secundária de carbono.

ZHAO e CHEUNG (2013) estabeleceram um modelo de mecanismo para utilização de β -glucanas oriundas de diversas fontes, pelo probiótico *Bifidobacterium infantis*, onde o processo de absorção e degradação das moléculas tem várias etapas. O primeiro passo é a ligação da β -glucana à superfície da bactéria, seguido da internalização da molécula através da membrana celular por transportadores de carboidratos do tipo ABC (*ATP-binding cassette transporters*) ou proteínas PTS (*phosphotransferase system*) e, então, a quebra do polímero em unidades de glucose ou oligossacarídeos pela ação das enzimas β -glucanas hidrolases, por fim ocorre a incorporação da glucose na via fermentativa central.

Sabe-se que os transportadores do tipo ABC apresentam vários componentes proteicos. Entre eles uma proteína ligadora de substrato, que fica ancorada na membrana celular e exposta para o lado externo da célula, a qual é capaz de reconhecer moléculas de glucanas β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-ligadas. O transporte ocorre de maneira diferencial de acordo com a massa molecular do polímero (ZHAO e CHEUNG, 2011). Já PTS está envolvida no transporte e fosforilação de uma variedade de carboidratos (ALTERMANN *et al.*, 2005). A utilização dessas moléculas por esse microrganismo também só é possível devido a presença da enzima 1,3- β -glucosidase (EC 3.2.1.58), cuja especificidade é alta para ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3), não ocorrendo diminuição da atividade na presença de substituições em C-6 da cadeia principal (BARRAS e STONE, 1969).

O genoma de *L. acidophilus* codifica uma grande variedade de genes relacionados à utilização de carboidratos, incluindo vinte sistemas fosfotransferase, PTS e cinco famílias de transportadores ABC, sendo que grande parte dos transportadores anotados não possui substrato conhecido (ALTERMANN *et al.*, 2005). Segundo BARRANGOU *et al.* (2006), a análise da transcrição das proteínas de *L. acidophilus* diferencialmente expressas em diferentes fontes de carbono,

indicou que mono e dissacarídeos nesse microrganismo são transportados via PTS, enquanto polissacarídeos são transportados por membros da família ABC.

Baseado na literatura, acredita-se que essas frações com elevado teor de glucanas ramificadas β -(1 \rightarrow 3,6)-ligadas, obtidas de microalgas marinhas que apresentaram potencial prebiótico, sejam utilizadas pela bactéria *L. acidophilus* de acordo com os mecanismos citados anteriormente: reconhecimento e internalização via transportadores ABC e degradação por β -(1 \rightarrow 3)glucanases até glucose, a qual é oxidada na via fermentativa. As frações contendo apenas glucanas β -(1 \rightarrow 3)-ligadas lineares apresentam solubilidade bem inferior, o que pode ter interferido na capacidade da bactéria utilizar essa molécula.

Os extratos alcalinos solúveis no tratamento de gelo-degelo e os sobrenadantes etanólicos, de ambas as microalgas, também apresentaram potencial para serem fermentados por *L. acidophilus*. As frações alcalinas (PGAL-S e PLAL-S), assim como os sobrenadantes etanólicos da extração alcalina (PGAL-SE e PLAL-SE), são muito similares entre si quanto à sua composição química (TABELA 14). Ambas apresentaram um alto teor de proteínas e uma composição monossacarídica heterogênea, contendo basicamente todos os açúcares fermentáveis pela bactéria utilizada neste trabalho, dentre eles em maior concentração manose, galactose e glucose. Portanto, acredita-se que esses açúcares tenham sido os responsáveis pelo crescimento bacteriano.

TABELA 14 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES COM MAIOR POTENCIAL PREBIÓTICO

Amostra	Cho ^a	Ptn ^b	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Frações aquosas									
PGAQ-S	68,6	18,1	2,0	7,0	tr ^c	tr ^c	2,0	3,4	83,6
PLAQ-S	59,9	17,9	3,1	11,4	tr ^c	tr ^c	2,0	3,3	78,3
PGAQ-SE	42,1	12,8	nd	nd	nd	nd	2,8	2,8	94,4
PLAQ-SE	27,2	12,3	tr ^c	tr ^c	tr ^c	tr ^c	3,7	4,9	91,4
Amostra	Cho ^a	Ptn ^b	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Frações alcalinas									
PGAL-S	15,3	38,4	4,1	6,6	9,0	11,2	12,2	24,2	32,5
PLAL-S	17,5	34,7	5,5	7,7	8,2	8,1	15,4	24,9	30,2
PGAL-SE	4,3	56,5	3,9	8,5	5,9	3,6	19,3	16,2	42,5
PLAL-SE	39,4	60,6	2,8	6,8	10,9	13,0	14,0	25,2	27,3

NOTA: ^a: Carboidratos; ^b: Proteínas; ^c: traço ≤ 1 mol %; nd: não detectado. Rha corresponde a ramnose, Fuc a fucose, Ara a arabinose, Xyl a xilose, Man a manose, Gal a galactose, Glc a glucose.

Os sobrenadantes etanólicos das frações aquosas (PGAQ-SE e PLAQ-SE), assim como as frações solúveis em gelo-degelo são ricas em glucose e análises de RMN (CAPÍTULO 1) indicaram que trata-se de β -glucanas (1 \rightarrow 3,6)-ligadas. Portanto, essas frações seriam utilizadas por *L. acidophilus* da mesma maneira que as demais glucanas ramificadas.

O entendimento atual a respeito de moléculas prebióticas é de que oligossacarídeos de baixa massa molecular são mais rápida e seletivamente fermentados por bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobactéria* do que seus correspondentes de alta massa molecular. Esta propriedade se deve ao fato de que substratos de baixa massa molecular têm mais terminais não redutores por unidade de massa, os quais favorecem o ataque mais rápido por enzimas dos organismos probióticos (LAM e CHEUNG, 2013). No presente trabalho não foi possível determinar o tamanho molecular das β -glucanas (devido à baixa solubilidade), entretanto acredita-se que não sejam moléculas de baixa massa molecular, ou oligossacarídeos, visto que não é possível observar nas análises de RMN (CAPÍTULO 1) sinais característicos de anômeros α e β de terminais redutores. Essas considerações abrem uma nova frente de trabalho para as glucanas obtidas de microalgas. Além disso, a atividade maior observada em frações contendo β -

glucanas ramificadas pode, também, estar associada à presença de alto grau de ramificação destas moléculas por terminais não redutores de glucose.

4.2.1 Análise da diminuição de pH

O pH do meio após a fermentação de moléculas não digeríveis tende a diminuir, devido a produção de AGCC que acidificam o meio. Dessa forma, a análise do pH das culturas é um indicativo da utilização dos carboidratos incorporados no meio de cultivo.

As frações com maior potencial prebiótico de acordo com as análises da cinética de crescimento PGAQ-S, PGAL-SE e PLAL-S foram submetidas à fermentação para avaliação da variação de pH (final menos inicial) e foram comparadas com a variação observada em meio contendo inulina e meio MRS, os resultados estão dispostos na TABELA 15.

TABELA 15 - VARIAÇÃO NO PH DAS CULTURAS DURANTE 48 H DE FERMENTAÇÃO IN VITRO DE DIFERENTES EXTRATOS DE MICROALGAS POR *L. acidophilus*

Amostra	pH (tempo 0 h)	pH (tempo 48 h)	Δ pH (final – inicial)
PGAQ-S	6,42 \pm 0,08	5,43 \pm 0,15 ^{A,B}	0,99 \pm 0,10
PGAL-SE	6,44 \pm 0,08	5,22 \pm 0,03 ^{A,B}	1,22 \pm 0,07
PLAL-S	6,34 \pm 0,01	5,77 \pm 0,01 ^{A,B}	0,57 \pm 0,01
Inulina	6,34 \pm 0,00	5,85 \pm 0,57 ^A	0,66 \pm 0,57
MRS	6,28 \pm 0,06	5,19 \pm 0,03 ^B	1,09 \pm 0,08

NOTA: Os valores representam a média \pm o desvio padrão. Valores na mesma coluna seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

O valor de pH no momento da inoculação (tempo zero) variou de 6,3 a 6,4, enquanto depois de 48 h de incubação variou de 5,2 a 5,8, o que indica a diminuição do pH em pelo menos unidade. Esses valores estão de acordo com os observados por MADHUKUMAR e MURALIKRISHNA (2010) e ZHAO e CHEUNG (2011), que avaliaram a fermentação de β -glucanas obtidas de variadas fontes como cereais, fungos, entre outros, por diferentes espécies de bifidobactérias. As culturas que alcançaram o menor valor de pH ao final das 48 h foram a fração PGAL-SE (variação de 1,22) e o caldo MRS comercial (variação de 1,09), embora

estatisticamente todas as frações tenham se mostrado iguais, exceto o meio contendo inulina do meio MRS comercial.

Os resultados apresentados na TABELA 15 confirmam a acidificação do meio, indicando que *L. acidophilus* foi capaz de metabolizar os componentes das frações de microalgas como fonte de carbono.

A avaliação prebiótica de moléculas não digeríveis também pode ser realizada em conjunto com outras técnicas, tais como: 1) análise da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que são excretados para o meio, podendo ser analisados tanto qualitativamente quanto quantitativamente por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ou GC-MS (*Gas chromatography–mass spectrometry*); 2) análise do consumo das fontes de carbono disponibilizadas no meio, este pode ser analisado por HPLC por exemplo, antes e depois do período de fermentação, a presença de oligo ou mesmo monossacarídeos, assim como a exaustão total da fonte pode ser observada por meio da comparação de cromatogramas.

Além disso, diversas metodologias para avaliação da atividade prebiótica estão descritas na literatura, como análise em cepas isoladas feitas neste trabalho, ou de um pool de bactérias obtidas diretamente das fezes de voluntários ou animais. Essas são submetidas ao crescimento em diversas fontes, e a verificação da população com maior potencial fermentativo se dá através da análise de expressão diferencial dos genes correspondentes a diferentes bactérias, ou pela técnica de FISH (hibridização fluorescente *in situ*) que utiliza sondas fluorescentes para detectar a presença de determinadas sequências de DNA. Ou ainda *in vivo* pela inclusão das moléculas a serem testadas na dieta de animais ou humanos e análise das fezes.

Os resultados obtidos através das técnicas utilizadas neste trabalho para avaliar a capacidade prebiótica de frações obtidas de microalgas, demonstram o potencial prebiótico de moléculas obtidas de ambas as microalgas *P. gyrans* e *P. lutheri*, principalmente β -(glucanas 1 \rightarrow 3,6)-ligadas, capazes de serem utilizadas por *L. acidophilus* como fonte de energia, uma vez que promoveram seu crescimento. Entretanto, para o uso dessas microalgas como fonte de prebióticos, acredita-se que esse potencial deva ser confirmado por análises da produção AGCC, por exemplo, e por testes em animais. *In vivo*, tanto as moléculas quanto as bactérias estão

desafiadas à um meio muito mais rico em interações, entre bactérias de diferentes espécies, entre bactéria e hospedeiro, na presença de uma grande variabilidade de substratos, o que torna o conceito de prebióticos muito mais complexo do que o observado nos experimentos *in vitro*.

O mecanismo sugerido para utilização dessas frações por *L. acidophilus*, também não pode ser confirmado pela técnica utilizada neste trabalho, para uma averiguação exata a respeito do mecanismo mais estudos em nível molecular, principalmente de transcrição diferencial de proteínas, podem ser realizados.

De acordo com LAM e CHEUNG (2013), a tendência que tem se observado para os estudos de β -glucanas como potenciais fontes de prebióticos é o aumento no número de pesquisas clínicas em humanos em relação à pesquisa básica, bastante realizada principalmente nos últimos dez anos. Já na pesquisa básica ainda é necessário aumentar os esforços para revelar os mecanismos moleculares por trás da fermentação seletiva de β -glucanas por diferentes cepas de bactérias probióticas.

Na literatura diversos trabalhos exploram o potencial prebiótico de β -glucanas. Entretanto, a fonte mais comum desses polímeros tem sido fungos, cereais, macroalgas e bactérias. Até o momento não foi encontrado relato de β -glucanas obtidas de microalgas, que é considerada uma boa fonte de obtenção de compostos bioativos, portanto a realização disso neste trabalho é inédita.

5 CONCLUSÕES

Inicialmente, com relação ao estabelecimento do protocolo para avaliação da capacidade prebiótica, conclui-se que a melhor concentração de inóculo para realização dos testes foi OD 0,01, a melhor concentração do padrão utilizado controle positivo e amostras foi 0,25 % (m/v), e que tanto padrão quanto amostras devem ser previamente esterilizadas para realização do teste, sem prejuízo na constituição das moléculas. As condições para realização do teste foram incubação a 37 °C em aerobiose por 48 h.

Os resultados obtidos mostram que três frações apresentaram crescimento significativamente superior ao controle positivo (inulina), são elas PGAQ-S, PGAL-SE e PLAL-S. Todas as demais frações apresentaram-se estatisticamente iguais a inulina. Dessa forma, infere-se que todas as frações obtidas de ambas as microalgas apresentam potencial prebiótico.

As frações que induziram as maiores variações no valor de OD são ricas em glucanas β -(1→3,6)-ligadas (exceto PLAL-S que têm uma composição monossacarídica heterogênea), enquanto as frações de glucanas β -(1→3)-ligadas lineares produziram um efeito muito menor na variação de OD. De acordo com o mecanismo descrito na literatura para utilização destes carboidratos, as moléculas lineares apresentam um menor potencial prebiótico devido a sua insolubilidade, o que prejudica a capacidade das bactérias de utilizá-las como fonte de energia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As microalgas do gênero *Pavlova* são muito conhecidas por conta da sua capacidade de crescimento rápido em larga escala, e por isso são muito utilizadas na aquicultura. Esta característica torna as microalgas utilizadas neste trabalho uma boa matéria-prima na obtenção de compostos bioativos.

Os polissacarídeos obtidos de *P. gyrans* e *P. lutheri* concentraram-se nas frações aquosas e são constituídos por β -glucanas lineares (1 \rightarrow 3)-ligadas e ramificadas β -(1 \rightarrow 3,6)-ligadas. β -Glucanas são moléculas já bem conhecidas, tanto quimicamente quanto com relação às diversas atividades biológicas já descritas (principalmente imunomoduladora). Distribuem-se de maneira muito ampla na natureza, estando presentes em plantas, bactérias, algas e microalgas, embora para as espécies utilizadas nesse trabalho não se tenha encontrado descrita até o momento, a caracterização química fina dos polissacarídeos, sendo, portanto, inédita a caracterização descrita neste trabalho.

As frações obtidas dessas microalgas foram testadas *in vitro* quanto a sua capacidade de ligação à enterobactéria patogênica *S. typhimurium* e quanto sua atividade prebiótica frente a *L. acidophilus*. Experimentos que se complementam na busca do conhecimento sobre a modulação de bactérias, tanto patogênicas quanto benéficas, que comumente habitam o trato gastrointestinal. Os resultados mostraram que as frações compostas por β -glucanas ramificadas foram as únicas que não foram capazes de se ligar a *S. typhimurium*. Já para os testes com *L. acidophilus*, todas as frações demonstraram potencial prebiótico, sendo pouco menor para as frações compostas por β -glucanas lineares. Até o momento, não foram encontrados na literatura pesquisas relacionando o extrato obtido de microalgas com capacidade de ligação à enteropatógenos ou capacidade prebiótica.

Os resultados observados indicam o potencial das frações obtidas de *P. gyrans* e *P. lutheri* em sua totalidade, uma vez que todas as frações, mesmo as alcalinas com baixo teor de carboidratos, foram ativas em ambos os testes. Mostraram, também, complementaridade entre as moléculas presente nos extratos, uma vez que as moléculas com menor atividade em um dos testes foram as mais ativas no outro e vice-versa.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho, mais estudos em nível molecular são necessários para verificar quais mecanismos estão envolvidos tanto no processo de ligação das frações ativas a bactérias patogênicas, quanto na utilização das mesmas por bactérias probióticas, assim como um screening com mais espécies de bactérias tanto patogênicas quanto probióticas para averiguar a amplitude da ação dessas moléculas, uma vez que o TGI é habitado por centenas de espécies de bactérias.

Além disso, testes *in vivo* explorariam o real efeito dessas frações em sistemas complexos envolvendo muitas variáveis, e auxiliariam no desenvolvimento de produtos, como os já existentes na área da pecuária que favorecem o crescimento e ganho de peso em animais de abate como aves, suínos e bovinos. Visto que as frações são compostas por moléculas que, além do já conhecido efeito imunoestimulante, mostraram-se capazes de modular as bactérias do TGI *in vitro*. O efeito prebiótico, por exemplo, é um efeito em cadeia, pois já é conhecido o papel das bactérias como *Lactobacillus* na proteção contra patógenos intestinais.

Acredita-se que o uso dessas frações, ou da própria biomassa microalgal, sejam promissores nessa área como um produto completo para a saúde animal aumentando a imunidade, impedindo a colonização por patógenos e estimulando a microbiota benéfica (a qual por si só já atua combatendo patógenos). A formulação de produtos a base de microalgas seria, ainda, interessante devido aos baixos custos associados à produção da biomassa.

REFERÊNCIAS

ALTERMANN, E. et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 11, p. 3906-3912, 2005.

BARCLAY, T. et al. Analysis of the hydrolysis of inulin using real time ¹H NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 352, n. 0, p. 117-125, 2012.

BARRANGOU, R. et al. Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 10, p. 3816-3821, 2006.

BARRAS, D. R.; STONE, B. A. β -1,3-glucan hydrolases from *Euglena gracilis*: II. Purification and properties of the β -1,3-glucan exo-hydrolase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 191, n. 2, p. 342-353, 1969.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 118-129, 2013.

BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médecine et maladies infectieuses**. p. 1–8, 2014

CORRADINI, C. et al. High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection and capillary zone electrophoresis with indirect ultra violet detection as powerful tools to evaluate prebiotic properties of fructooligosaccharides and inulin. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 165-173, 2004.

CORZO-MARTÍNEZ, M. et al. *In vitro* bifidogenic effect of Maillard-type milk protein–galactose conjugates on the human intestinal microbiota. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 2, p. 127-131, 2013.

CRONIN, M. et al. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 4-18, 2011.

DE MORENO DE LEBLANC, A.; CASTILLO, N. A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 223-231, 2010.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, Supplement, n. 0, p. S15-S28, 2010.

GIBSON, G. R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1438S-1441s, 1999.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GRIMOUD, J. et al. *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. **Anaerobe**, v. 16, n. 5, p. 493-500, 2010.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006.

KAPLAN, H.; HUTKINS, R. W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2682-2684, 2000.

KLEEREBEZEM, M. et al. The extracellular biology of the lactobacilli. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 199-230, 2010.

KORETZ, R. L. Probiotics, critical illness, and methodologic bias. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 24, n. 1, p. 45-49, 2009.

KUDA, T.; ENOMOTO, T.; YANO, T. Effects of two storage β -1,3-glucans, laminaran from *Eicenia bicyclis* and paramylon from *Euglena gracili*, on cecal environment and plasma lipid levels in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 4, p. 399-404, 2009.

LAM, K.-L.; CHI-KEUNG CHEUNG, P. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, n. 1, p. 45-64, 2013.

LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 219-225, 2010.

LICHT, T. R.; EBERSBACH, T.; FRØKIÆR, H. Prebiotics for prevention of gut infections. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 2, p. 70-82, 2012.

MACFARLANE, G. T. et al. Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 101, p. 81-88, 1992.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Review Immunology**, v. 4, n. 6, p. 478-485, 2004.

MADHUKUMAR, M. S.; MURALIKRISHNA, G. Structural characterisation and determination of prebiotic activity of purified xylo-oligosaccharides obtained from Bengal gram husk (*Cicer arietinum* L.) and wheat bran (*Triticum aestivum*). **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 215-223, 2010.

MELLITZER, G. et al. Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1708-1721, 2010.

MURPHY, P. et al. Analysis of bacterial community shifts in the gastrointestinal tract of pigs fed diets supplemented with β -glucan from *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* and *Saccharomyces cerevisiae*. **animal**, v. 7, n. 07, p. 1079-1087, 2013.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587-597, 2007.

PAGNINI, C. et al. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 1, p. 454-459, 2010.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2008.

PLAZA, M. et al. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 450-455, 2010.

POMPEI, A. et al. *In vitro* comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. **Anaerobe**, v. 14, n. 5, p. 280-286, 2008.

QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 213-218, 2010.

RAMNANI, P. et al. *In vitro* fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2012.

REDMAN, M. G.; WARD, E. J.; PHILLIPS, R. S. The efficacy and safety of probiotics in people with cancer: a systematic review. **Annals of Oncology**, 2014.

REMUS, D. M.; KLEEREBEZEM, M.; BRON, P. A. An intimate tête-à-tête — How probiotic lactobacilli communicate with the host. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, Supplement 1, n. 0, p. S33-S42, 2011.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept Revisited. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830S-837S, 2007.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SCHEPPACH, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. **Gut**, v. 35, n. 1 Suppl, p. S35-S38, 1994.

SHEN, R.-L. et al. Effects of oat β -glucan and barley β -glucan on fecal characteristics, intestinal microflora, and intestinal bacterial metabolites in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11301-11308, 2012.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, p.1417-1435, 2013.

SNART, J. et al. Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1925-1931, 2006.

SYNYTSYA, A. et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 548-556, 2009.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1031-1064, 2001.

VARDAKOU, M. et al. Evaluation of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 1–2, p. 166-170, 2008.

VOLMAN, J. J. et al. Dietary (1→3), (1→4)- β -d-glucans from oat activate nuclear factor- κ B in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. **Nutrition Research**, v. 30, n. 1, p. 40-48, 2010.

WELLS, J. M.; MERCENIER, A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. **Nature Review Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 349-362, 2008.

WELLS, J. M. et al. Epithelial crosstalk at the microbiota–mucosal interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4607-4614, 2011.

WILLIAMS, B. A. et al. *In vitro* fermentation kinetics and end-products of cereal arabinoxylans and (1,3;1,4)- β -glucans by porcine faeces. **Journal of Cereal Science**, v. 53, n. 1, p. 53-58, 2011.

YANG, B. et al. Structural characteristics of oligosaccharides from soy sauce lees and their potential prebiotic effect on lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 590-594, 2011.

ZHAO, J.; CHEUNG, P. C. K. Fermentation of β -glucans derived from different sources by bifidobacteria: evaluation of their bifidogenic effect. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 5986-5992, 2011.

ZHAO, J.; CHEUNG, P. C. K. Comparative proteome analysis of *bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* grown on β -glucans from different sources and a model for their utilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 18, p. 4360-4370, 2013.

ZUBIA, M. et al. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 693-701, 2009.